

Die Bedeutung des Serumantigens des Onkoproteins HER-2/neu für die Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

**Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Experimentelle Onkologie**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

**Frau Dr. med. Diana Lüftner
geboren am 01. März 1967 in Burghausen**

Präsident: Prof. Dr. rer. Nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Eingereicht am: Mai 2003

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 12. Februar 2004

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Rolf Kreienberg**
- 2. Prof. Dr. med. Hans-Jochen Illiger**

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	8
2. Einleitung.....	23
3. Fragestellungen.....	28
4. Material und Methoden	32
4.1. Gesunde Referenzkollektive gemäß Blutspenderkriterien	32
4.1.1. Monozentrische Untersuchungen	32
4.1.2. Multizentrische Untersuchung für automatisierten s-HER-2/neu-Assay.....	33
4.2. Patientinnenkollektiv in den Stadien I-III: Table-Studie.....	34
4.3. Patientinnenkollektive im Stadium IV zur Verlaufsbeobachtung	36
4.3.1. Wöchentlich fraktioniertes Paclitaxel als Zweit- oder Drittlinientherapie	36
4.3.2. Patientinnenkollektiv unter diversen Arten und Linien der Chemotherapie.....	39
4.3.3. Kombination von Chemotherapie und Herceptin	39
4.4. Patientinnenkollektive zur HER-2/neu-Konkordanzanalyse	40
4.4.1. Immunhistochemie des Primärtumors und s-HER-2/neu im Stadium IV.....	40
4.4.2. Subgruppenanalyse mit IHC des Primärtumors, computerisierter IHC-Befundung, FISH und s-HER-2/neu im Stadium IV	41
4.5. Methoden der s-HER-2/neu-Bestimmung	42
4.5.1. Chiron® -Assay.....	42
4.5.2. Oncogene® -Assay.....	43
4.5.3. Immuno 1®-Plattform	44
4.6. Methodik der s-EGFR-Bestimmung.....	45
4.7. Methodik der s-uPA-Bestimmung	45
4.8. Methodik der CA 27.29-Bestimmung	46
4.9. Methodik der HER-2/neu-Immunhistochemie	47
4.10. Methodik der computerisierten HER-2/neu-IHC-Befundung.....	48
4.11. Methodik der HER-2/neu-Fluoreszenz-<i>in situ</i>-Hybridisierung.....	50
4.12. Begriffliche Definitionen	52
4.12.1. Prognose.....	53
4.12.2. Prädiktivität	54
4.12.3. Gemischt prognostische und prädiktive Faktoren.....	55
4.12.4. Monitoring.....	56
4.12.5. Screening	57
4.13. Statistik.....	57
4.13.1. Bestimmung der cut-off-Werte von s-HER-2/neu, s-EGFR, s-uPA und CA 27.29.....	58
4.13.2. Multizentrische Untersuchung zu s-HER-2/neu	58
4.13.3. Analysen im Rahmen der Table-Studie.....	59
4.13.4. Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel.....	60
4.13.5. Erweiterte Untersuchung zur Prädiktivität unter Mehrlinienchemotherapie	60
4.13.6. Monitoring durch s-HER-2/neu unter Herceptin-Therapie.....	61
4.13.7. Verteilung von IHC des Primärtumors und s-HER-2/neu im Stadium IV.....	62

4.13.8. Konkordanz von Immunhistochemie (mit ACIS), FISH und s-HER-2/neu	62
5. Ergebnisse	63
5.1. Ermittlung des cut-off-Wertes für s-HER-2/neu	63
5.1.1. Chiron [®] -Assay.....	63
5.1.2. Oncogene [®] -Assay.....	65
5.1.3. Immuno 1 [®] -Plattform	67
5.2. Korrelation der verschiedenen Methoden der s-HER-2/neu-Bestimmung	70
5.3. Einfluß von Herceptin auf die Messung von s-HER-2/neu	73
5.4. Ermittlung des cut-off-Bereiches für s-EGFR	74
5.5. Ermittlung des cut-off-Bereiches für s-uPA.....	76
5.6. Ermittlung des cut-off-Wertes für CA 27.29.....	78
5.7. s-HER-2/neu im Rahmen der Table-Studie	79
5.7.1. Regulation von s-HER-2/neu während ovarieller Ablation.....	81
5.7.2. Konstanz von CA 27.29 während ovarieller Ablation.....	86
5.7.3. Prognostische Bedeutung von s-HER-2/neu in der adjuvanten Situation.....	90
5.8. Prädiktivität und Monitoring durch s-HER-2/neu im Stadium IV.....	90
5.8.1. Chemotherapie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel.....	91
5.8.2. Multivariate Analyse unterschiedlicher Serumparameter unter Mehrlinien-Chemotherapie	100
5.9. Konkordanzanalysen verschiedener Methoden der HER-2/neu-Bestimmung im Hinblick auf die Patientinnenselektion für eine Herceptin-Therapie	119
5.9.1. IHC des Primärtumors und s-HER-2/neu im Stadium IV	120
5.9.2. Subgruppenanalyse mit IHC, computerisierter IHC-Befundung, FISH und s-HER-2/neu im Stadium IV	121
6. Diskussion	134
Literatur	160
Abkürzungen	171
Registered trade marks mit Kontaktadressen	173
Technische und finanzielle Unterstützung	175
Danksagung.....	176
Eidesstattliche Versicherung	178
Anhang über weitere themenbezogene Forschungsprojekte	179

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Filter und Wellenlängen für die HER-2/neu-Fluoreszenzmikroskopie	52
Tabelle 2: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-HER-2/neu mit dem Chiron-Assay	64
Tabelle 3: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-HER-2/neu mit dem Oncogene-Assay	66
Tabelle 4: Spezifität des Immuno 1-s-HER-2/neu-Assays für den cut-off-Wert von 15 ng/ml (25;40)	69
Tabelle 5: Messung von s-HER-2/neu in einer Verdünnungsreihe mit steigender Herceptin-Konzentration (27)	73
Tabelle 6: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-EGFR	75
Tabelle 7: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-uPA	76
Tabelle 8: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für CA 27.29	78
Tabelle 9: Demographische Angaben zu den Patientinnen im s-HER-2/neu-Projekt zur Table-Studie	82
Tabelle 10: Modulation von s-HER-2/neu (ng/ml) unter hormoneller Ablation	83
Tabelle 11: Konstanz von CA 27.29 (U/ml) unter hormoneller Ablation	87
Tabelle 12: Demographische Angaben der Patientinnen unter wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel	92
Tabelle 13: Überblicksdarstellung des Bezugs von s-HER-2/neu mit dem Therapieansprechen (CD, PR, SD versus PD), dem progressionsfreien Überleben und der Dauer der Response	93
Tabelle 14: Verschlechterung des progressionsfreien Überlebens bei Wahl eines höheren s-HER-2/neu-cut- offs >15 ng/ml im Sinne eines Hinweises auf biologische Subgruppen der s-HER-2/neu-Positivität	96
Tabelle 15: Veränderung des s-HER-2/neu-Spiegels unter Therapie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel (Referenzzeitpunkte: baseline und Zeitpunkt der best response-Evaluierung)	98
Tabelle 16: Demographische Angaben zu den Patientinnen unter Mehrlinienchemotherapie	101
Tabelle 17: Art, Linie und Erfolg der Chemotherapie im Beobachtungszeitraum	102
Tabelle 18: Überblick über die biochemischen Serumergebnisse (der Range bezieht sich auf alle gemessenen Proben, im übrigen werden Mittelwert, Median und Perzentilen der baseline-Probe angegeben)	103
Tabelle 19: Mittlere baseline-Spiegel der biochemischen Marker und ihre Assoziation zu Tumorlast und Tumorlokalisation	104
Tabelle 20: Ergebnisse der univariaten Analyse zu Ansprechen und progressionsfreiem Intervall. Angegeben werden nur die Parameter, die auf mindestens einen der Endpunkte einen statistisch signifikanten Einfluß erbrachten.	107
Tabelle 21: Ergebnisse der Cox-Regression zum Einfluß auf das progressionsfreie Intervall	109
Tabelle 22: Ergebnisse der Varianzanalyse für Meßwiederholungen von baseline zum Zeitpunkt der best response (paarweise Vergleiche wurden nach Bonferroni-Holm adjustiert: 0,05/6=0,0083, 0,05/5=0,01, 0,05/4=0,0125, 0,05/3=0,0167, 0,05/2=0,025)	110
Tabelle 23: Demographische Angaben zu den Herceptin-Patientinnen	114
Tabelle 24: Therapieansprechen und s-HER-2/neu-Verlauf (p<0,005)	115
Tabelle 25: Qualität des Monitorings unter Herceptin-Therapie	115
Tabelle 26: Darstellung der Verteilung von Ansprechen auf Herceptin-Therapie und Höhe des baseline-s- HER-2/neu-Spiegels (p>0,05)	117
Tabelle 27: Übersicht über HER-2/neu-Proteinüberexpression und s-HER-2/neu-Spiegel bei 101 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom	120

Tabelle 28: Demographische Daten zu den Patientinnen in der HER-2/neu-Konkordanzanalyse	122
Tabelle 29: Konkordanz der FISH-Ergebnisse in Relation zu A: der manuellen Befundung des DAKO HercepTests (Konkordanz 83,6%); B: der computerisierten Befundung auf dem ACIS-System (Konkordanz 88,5%). Die beste Konkordanz ergibt sich zwischen der manuellen und der automatisierten Befundung in C (Konkordanz 95,1%).....	123
Tabelle 30: Konkordanzkoeffizienten zu allen Vergleichen der HER-2/neu-Gewebeergebnisse mit unterschiedlichen Methoden und Befundungsansätzen (manuell versus computerisiert).....	124
Tabelle 31: Korrelation von HER-2/neu-Gewebestatus mit unterschiedlichen Nachweismethoden und s-HER-2/neu-Spiegel zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung	126
Tabelle 32: Beispiele für Patientinnen aus der HER-2/neu-Konkordanzanalyse mit allen untersuchten Materialien in allen Methoden. Die Farben sollen graphisch darstellen, daß HER-2/neu semiquantitativ befundet wird, obwohl eine nicht-dichotome Expression zugrunde liegt.	129
Tabelle 33: Vergleich von Testkriterien des s-CTA aus den Herceptin-Studien mit dem Oncogene-Assay (24;81)	136
Tabelle 34: s-HER-2/neu-Spiegel und outcome von Hormontherapien im Stadium IV.....	144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Algorithmus zum komplementären Einsatz von s-HER-2/neu in der HER-2/neu-Diagnostik (↑ = erhöhter s-HER-2/neu-Spiegel; ↓ = normal niedriger s-HER-2/neu-Spiegel).....	18
Abbildung 2: Strukturhomologie zwischen den 4 Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie. Die Struktur des EGF-Rezeptors wird hierbei als Referenz mit 100% Identität definiert (3).....	24
Abbildung 3: Bildung von Dimeren zwischen verschiedenen Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie und ihre biologischen Effekte nach Aktivierung von Signaltransduktionssystemen.....	25
Abbildung 4: Nachweismethoden der HER-2/neu-Überexpression. A: Normale Epithelzelle; B: HER-2/neu-überexprimierende Zelle.	27
Abbildung 5: Hardware des ACIS-Systems mit automatisierter Lichtmikroskopie und nachgeschalteter Bildverarbeitung am Computer (mit freundlicher Genehmigung von ChromaVision® Medical Systems, San Juan Capistrano, USA).	48
Abbildung 6: Konzeptionelle Darstellung eines prognostischen Faktors (nach Hayes et al., 1998) (30).....	53
Abbildung 7: Konzeptionelle Darstellung eines prädiktiven Faktors (nach Hayes et al., 1998) (30).....	54
Abbildung 8: Konzeptionelle Darstellung eines kombiniert prognostischen und prädiktiven Faktors (nach Hayes et al., 1998) (30).....	55
Abbildung 9: Verteilung der s-HER-2/neu-Werte, gemessen mit dem Chiron-Assay, bei gesunden Frauen .	64
Abbildung 10: ROC-Kurve zur cut-off-Ermittlung für den Chiron-Assay.....	65
Abbildung 11: Verteilung der s-HER-2/neu-Werte, gemessen mit dem Oncogene-Assay, bei gesunden Frauen	66
Abbildung 12: ROC-Kurve zur Grenzwertermittlung für den Oncogene-s-HER-2/neu-Assay	67
Abbildung 13: Verteilung der s-HER-2/neu-Konzentrationen bei gesunden Frauen (25;40).....	68
Abbildung 14: Sensitivität von s-HER-2/neu für den cut-off-Wert von 15 ng/ml in Bezug auf das Stadium des Mammakarzinoms (25;40).....	70
Abbildung 15: Korrelation der s-HER-2/neu-Bestimmungen mit dem Oncogene- und dem Chiron-Assay...	71
Abbildung 16: Korrelation der s-HER-2/neu-Bestimmungen mit dem Oncogene- und dem Immuno 1-Assay	72
Abbildung 17: Verteilung von s-EGFR bei Kontrollpersonen (A) sowie Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (B).....	74
Abbildung 18: ROC-Kurve zur cut-off-Bestimmung für s-EGFR	75
Abbildung 19: ROC-Kurve zur cut-off-Ermittlung für s-uPA	77
Abbildung 20: ROC-Kurve zur cut-off-Ermittlung für CA 27.29	79
Abbildung 21: Anstieg von s-HER-2/neu während hormoneller Ablation.....	84
Abbildung 22: s-HER-2/neu (A), Östradiol (B, Darstellung ohne Ausreißer) und CA 27.29 (C) von Leuprorelin-Patientinnen im Vergleich zu CMF-Patientinnen. Während der Östradiol-Mittelwert (MW) in beiden Gruppen signifikant abfällt, steigt der s-HER-2/neu-Spiegel statistisch signifikant an ($p < 0,0001$).	85
Abbildung 23: Konstante CA 27.29-Spiegel unter adjuvanter Therapie. Die Patientinnen aus der Ukraine zeigten deutlich erhöhte Eingangswerte und wurden daher separat ausgewertet.....	88
Abbildung 24: Relative Randeffekte für s-HER-2/neu (A), Östradiol (B) und CA 27.29 (C) in der nichtparametrischen Varianzanalyse für Meßwiederholungen.	89

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve über das progressionsfreie Überleben für alle Patientinnen unabhängig vom s-HER-2/neu-Spiegel (n=35) und für die s-HER-2/neu-positive Untergruppe (n=22) im Vergleich zu den Patientinnen mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel (n=13).....	94
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Dauer der response für alle Patientinnen unabhängig vom s-HER-2/neu-Spiegel (n=14) und für die s-HER-2/neu-positive Untergruppe (n=9) im Vergleich zu den Patientinnen mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel (n=5).....	95
Abbildung 27: Kasuistiken zum longitudinalen Verlauf von s-HER-2/neu. A: Patientin mit partieller Remission und späterer Progression. B: Patientin mit primärer Progression.....	97
Abbildung 28: Graphische Darstellung der s-HER-2/neu-Verläufe. A: Patientinnen mit Remission auf wöchentliches Paclitaxel. B: Patientinnen mit primärer Progression.....	99
Abbildung 29: s-EGFR und seine schwache Korrelation zum Menopausenstatus (p=0,009) und zum Alter im allgemeinen (p=0,014)	105
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Intervall in Abhängigkeit vom Remissionsstatus	106
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Intervall in Relation zum HER-2/neu-Ergebnis mit unterschiedlichen Nachweismethoden.....	108
Abbildung 32: Relative Randeffekte der longitudinalen Verläufe von baseline bis zum Zeitpunkt der best response für alle Serumparameter	112
Abbildung 33: Kasuistik für Monitoring mit s-HER-2/neu unter Herceptin-Therapie.....	116
Abbildung 34: ROC-Kurve zur Unterscheidung von Progression und klinischem Benefit durch den relativen s-HER-2/neu-Abfall zur Woche 4.....	118
Abbildung 35: s-HER-2/neu-Spiegel von FISH-positiven Patientinnen im Vergleich zu FISH-negativen Patientinnen	125
Abbildung 36: Explorative Analyse der metrischen ACIS-IHC-Scores und der s-HER-2/neu-Spiegel (Gruppen 1-3 sind im Text beschrieben).....	128
Abbildung 37: FISH und IHC von Primärtumor (A) und regionärer LK-Metastase (B) der Patientin 44KH. Alle Ergebnisse sind eindeutig HER-2/neu-positiv. Der Serumspiegel bei Fernmetastasierung lag bei 142 ng/ml.	130
Abbildung 38: Weichteilmetastasen (FISH und IHC) der Patientin 15HE. Die IHC in A ist mit dem HercepTest mit 0 befundet, die danebenliegende Metastase in B mit einem Score von +2. Der s-HER-2/neu-Spiegel lag bei 16 ng/ml.	131
Abbildung 39: Primärtumor der Patientin 13GI: Während der Paraffinschnitt in A als IHC-negativ eingestuft wurde, lag der Score in B bei +2. Grundsätzlich wurden beide Ergebnisse auf dem ACIS-System bestätigt. Die FISH-Untersuchung war für beide Schnitte negativ. Das präexistierende gesunde Drüsengewebe in C zeigt ebenfalls eine HER-2/neu-Expression.	132
Abbildung 40: Algorithmus zum komplementären Einsatz von s-HER-2/neu in der HER-2/neu-Diagnostik	157

1. Zusammenfassung

Fragestellungen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der prognostischen und prädiktiven Bedeutung der Serummessung des shed antigens des Onkoproteins HER-2/neu (s-HER-2/neu) für Mammakarzinompatientinnen in unterschiedlichen Erkrankungsstadien sowie unter verschiedenen Formen der Systemtherapie inklusive der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Herceptin®. Hierbei wurde der Stellenwert von s-HER-2/neu mit weiteren biochemischen Serummarkern (s-EGFR, s-uPA, CA 27.29) und etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms verglichen. Da HER-2/neu zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung mit verschiedenen Methoden an unterschiedlichen Materialien bestimmt werden kann, mußte schwerpunktmäßig auch die differentielle Wertigkeit von s-HER-2/neu im Vergleich zu Methoden der HER-2/neu-Bestimmung am Tumormaterial untersucht werden. Hierbei wurde insbesondere hinterfragt, ob die verschiedenen Methoden der HER-2/neu-Diagnostik stets zum gleichen Ergebnis führen, welche biologischen und technischen Ursachen möglichen Diskordanzen zugrundeliegen, und welche Konsequenzen diese Diskordanzen für die Therapiewahl (vor allem mit Herceptin beim metastasierten Mammakarzinom) mit sich bringen.

Grenzwertbestimmungen der Serummarker

Zunächst galt es, die cut-off-Werte für s-HER-2/neu im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv und im Vergleich zu Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen zu etablieren. Hierbei konnte sowohl für den manuellen Oncogene®-Assay wie auch für die erste automatisierte Version auf dem klinisch-chemischen Analysenapparat Immuno 1® ein oberer cut-off von 15 ng/ml ermittelt werden.

Für s-EGFR wurde bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom ein cut-off-Bereich von 52-76 ng/ml ermittelt. Im Gegensatz zu s-HER-2/neu konnten keine

Erhöhungen des s-EGFR-Spiegels bei Patientinnen im Stadium IV des Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Stattdessen lag bei rund einem Drittel der Patientinnen der s-EGFR-Spiegel niedriger als bei der weiblichen Normalbevölkerung. Dies kann als Hinweis auf unterschiedliche regulatorische und/oder posttranslationale Mechanismen von (s-)EGFR im Vergleich zu (s-)HER-2/neu gewertet werden.

Für s-uPA wurde der cut-off-Bereich von 857-1830 pg/ml ermittelt. Es soll betont werden, daß sich die bislang im Rahmen von Studien ermittelten und publizierten Daten beim Mammakarzinom fast ausschließlich auf den Gewebenachweis von uPA, zum Teil zusammen mit seinem Gegenspieler PAI-1, beziehen und diese Daten nur bedingt und unter Berücksichtigung der methodischen Unterschiede mit den Ergebnissen dieser Habilitationsschrift verglichen werden können.

Die drei genannten Serummarker s-HER-2/neu, s-EGFR und s-uPA wurden stets in Bezug gesetzt zu dem „klassischen“ Tumormarker CA 27.29, besser bekannt unter dem quasi als Synonym benutzten Namen CA 15-3, mit dem CA 27.29 inhaltlich gleichgesetzt werden kann. Lediglich die Bestimmungsmethodik unterscheidet sich in der Wahl des detektierenden Antikörpers bei geringfügig unterschiedlichem Epitop. Für CA 27.29 wurde ein oberer cut-off-Wert von 30 U/ml identifiziert. CA 27.29 gilt in erster Linie als Indikator der Tumormasse.

Bedeutung und Regulation von s-HER-2/neu unter adjuvanter Hormon- und Chemotherapie

Die prognostische Bedeutung von s-HER-2/neu sollte im Rahmen einer multizentrischen, prospektiv randomisierten Studie geprüft werden. In der als „Table-Studie“ bekannten Phase III-Untersuchung wurde bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen die Wirksamkeit und Sicherheit einer 2-jährigen, postoperativen, hormonablativen Therapie mit dem GnRH-Analogen Leuprorelin im Vergleich zu einer adjuvanten Standardchemotherapie nach dem CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) untersucht. Zur Dokumentation des endokrinen Status durch

Serummessungen von FSH, LH und Östradiol hatten laut Protokoll regelmäßig Blutentnahmen zu den Zeitpunkten Monat 0 (= baseline), Monat 3, Monat 6 (= Ende der CMF-Chemotherapie), Monat 12, Monat 18 und Monat 24 (= Ende der Leuprorelin-Hormontherapie) stattgefunden. Wir testeten diese Seren aus beiden Therapiearmen auf s-HER-2/neu und CA 27.29 mit der initialen Frage, ob der s-HER-2/neu-Spiegel vor Einleitung der systemischen Therapie und/oder der Verlauf von s-HER-2/neu unter Therapie in Zusammenhang mit dem Auftreten eines Rezidivs bzw. dem Zeitpunkt des relapses steht.

Bei einer Gesamtzahl von n=113 Patientinnen mit einem Serumverlauf über 2 Jahre zeigte nur eine Patientin eine postoperative Erhöhung von s-HER-2/neu >15 ng/ml vor Einleitung der systemischen Chemotherapie, zudem war insgesamt die Anzahl an Rezidiven im Beobachtungszeitraum noch sehr gering, so daß sich die prognostische Bedeutung nicht erfassen ließ. Dieser geringe Anteil an Patientinnen in der Primärsituation mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel paßt gut zu den publizierten Daten zu s-HER-2/neu in der Primär- und Rezidivdiagnostik des Mammakarzinoms, die einen erhöhten Spiegel von s-HER-2/neu über dem oberen cut-off-Wert bei nur ca. 5% aller Mammakarzinompatientinnen angeben. Für diesen geringen Anteil der Patientinnen ist die ungünstige Bedeutung von s-HER-2/neu mit dem hier benutzten, standardisierten Test allerdings gesichert. Offen bleibt zunächst, ob die s-HER-2/neu-Konzentration auch innerhalb des cut-off-Bereiches noch eine prognostische oder prädiktive Information beinhaltet. Diese Frage werden wir in einer späteren Analyse bei einer höheren Anzahl an rezidivierenden Patientinnen betrachten.

In der Table-Studie fiel in beiden Therapiearmen ein statistisch signifikanter Anstieg von s-HER-2/neu im longitudinalen Verlauf von 8,1 ng/ml bei Therapiebeginn auf 11,0 ng/ml zum Beobachtungsende nach 2 Jahren auf, allerdings höchst selten und wenn, dann nur in geringem Maße, über den ermittelten oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml. Dieser Anstieg war bei der temporären hormonellen Ablation mit dem GnRH-Analogon Leuprorelin nach Absetzen der Therapie reversibel. Somit stehen unsere Serumergebnisse im Einklang mit publizierten präklinischen wie auch klinischen Daten, welche für HER-2/neu in der Zellkultur wie auch *in vivo* am Tumorgewebe eine Regulation durch Östradiol und strukturell verwandte Substanzen nachweisen konnten. Die klinische Relevanz der

Ergebnisse besteht darin, daß die immunhistochemisch bestimmte HER-2/neu-Expression im Gewebe und die ggf. später im Rezidiv zu fällende Entscheidung über eine Herceptin-Therapie bei der prämenopausalen Patientin vom OP-Zeitpunkt während des Menstruationszyklus abhängen könnten. Auch die seit Jahren bekannte Abhängigkeit der Prognose vom Zeitpunkt der Primäroperation während des Menstruationszyklus könnte unter anderem mit der hormonellen Regulation von HER-2/neu zusammenhängen. Dies ist nach unserem Wissen die erste longitudinale Untersuchung an prämenopausalen Patientinnen, die mittels der Serummessung von HER-2/neu die zyklusabhängige Regulation dieses Onkoproteins statistisch signifikant nachweist.

Prädiktive Bedeutung von s-HER-2/neu im Stadium IV (Phase II-Studie)

Im Stadium IV des Mammakarzinoms wurde s-HER-2/neu zunächst im Rahmen einer monozentrischen, klinischen Phase II-Studie an 35 Patientinnen unter Therapie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel auf seine prädiktive Wertigkeit untersucht. Wir fanden ein statistisch signifikant kürzeres progressionsfreies Intervall sowie eine verkürzte Remissionsdauer ab einem geringfügig erhöhten s-HER-2/neu-baseline-Spiegel ≥ 22 ng/ml. Je höher die s-HER-2/neu-Konzentration anstieg, desto kürzer wurde das progressionsfreie Überleben. Im Gegensatz dazu fanden wir keinen Unterschied bezüglich der Ansprechrate zwischen der s-HER-2/neu-positiven und der s-HER-2/neu-negativen Subgruppe im untersuchten Kollektiv. Dies wurde als eine durchaus gute Empfindlichkeit von (s-)HER-2/neu-positiven Mammakarzinompatientinnen gegenüber dem Zytostatikum Paclitaxel interpretiert, die sich in eine verbesserte Remissionserhaltung bzw. eine Progressionsverzögerung umsetzt. Es muß auch berücksichtigt werden, daß bei einer moderaten Ausgangsfallzahl die Zahl an Remissionen niedrig war und damit die statistische power des Vergleichs von Remissionsstatus und s-HER-2/neu-Spiegel nicht ausreichend groß war. Zudem gilt die Remissionsbeurteilung im Vergleich zu Überlebensparametern als unsicherer.

Da die aktuelle Datenlage für eine Sensitivität von HER-2/neu-positiven Mammakarzinomen gegenüber anthrazyklinhaltigen Formen der Chemotherapie spricht,

sollte die Kombination von Anthrazyklinen und Taxanen schwerpunktmäßig in prospektiven klinischen Studien zum metastasierten Mammakarzinom untersucht werden.

Erstmals untersucht wurde auch das Monitoring mittels longitudinaler s-HER-2/neu-Messung unter wöchentlich fraktionierter Chemotherapie mit Paclitaxel. Während der s-HER-2/neu-Spiegel bei einem objektiven Ansprechen um im Mittel 19,6 ng/ml abfiel, stieg der s-HER-2/neu-Spiegel bei Patientinnen mit primärer Progression um im Mittel 17,3 ng/ml an. Die Subgruppenanalyse mit Einteilung der Patientinnen in responder und non-responder führte zu kleinen Gruppen, so daß der Vergleich der Verläufe zwischen den Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied erbringen konnte. Die Fragestellung wurde daher bei erhöhter Fallzahl und einem gemischten Kollektiv erneut betrachtet (siehe nächster Abschnitt). Es ist zu beachten, daß bei zwei Drittel der Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-baseline-Spiegel und Ansprechen auf die Chemotherapie die s-HER-2/neu-Konzentration unter den oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml abfiel. Die Patientinnen mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel bei Therapiebeginn zeigten im Verlauf keine relevante Veränderung ihrer s-HER-2/neu-Konzentration.

Prädiktive Bedeutung von verschiedenen Serummarkern im Stadium IV (gemischtes Kollektiv)

Aufgrund der moderaten Fallzahl konnte in der Untersuchung mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel weder eine multivariate Analyse zum Einfluß von s-HER-2/neu durchgeführt werden, noch wäre es statthaft gewesen, angesichts des selektionierten Krankengutes das Ergebnis zu verallgemeinern. Wir veränderten daher das Kollektiv für die Folgeuntersuchung qualitativ und quantitativ. Die Anzahl der Patientinnen wurde verdreifacht und es wurden zusätzliche biochemische Faktoren (s-EGFR, s-uPA, CA 27.29) integriert. Diese wurden auf ihre prädiktive Wertigkeit für das Ansprechen auf eine systemische Chemotherapie untersucht. In dieser erweiterten Analyse zum metastasierten Mammakarzinom wurde im Sinne eines „proof of concept“ kein homogenes Patientinnenkollektiv aus einer klinischen Studie untersucht, sondern ein gemischtes

Kollektiv unter verschiedenen Chemotherapieschemata und auch unterschiedlichen Linien der Vorbehandlung.

Von allen in die multivariate Analyse eingegangenen, demographischen, tumorspezifischen und biochemischen Daten zeigten nur das Ansprechen auf die Chemotherapie, die Anzahl der befallenen Organe und die s-HER-2/neu-Konzentration einen statistisch signifikanten Einfluß auf das progressionsfreie Überleben. Insbesondere die biochemischen Indikatoren der Tumormasse fielen multivariat nicht mehr ins Gewicht. Patientinnen mit einem s-HER-2/neu-Spiegel ≥ 18 ng/ml zeigten ein kürzeres progressionsfreies Intervall (19 Wochen) unter einer systemischen Chemotherapie als Patientinnen mit einem normalem s-HER-2/neu-Spiegel (34 Wochen). Die HER-2/neu Gewebediagnostik hatte nur für den Nachweis mittels FISH, aber nicht mittels Immunhistochemie, in der univariaten Analyse ein statistisch signifikantes Ergebnis erbracht. Die Anzahl der FISH-Resultate war aber zu gering, um eine Berücksichtigung in der multivariaten Analyse zu ermöglichen.

Für das Monitoring ergaben die untersuchten biochemischen Marker sehr unterschiedliche Ergebnisse: s-EGFR zeigte keinen Bezug zur Tumormasse und eignet sich daher nicht für das Monitoring. Wir konnten zeigen, daß die s-EGFR-Spiegel bei postmenopausalen Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom statistisch signifikant niedriger sind als bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen (56,5 ng/ml im Vergleich zu 64,7 ng/ml). Zudem fällt die s-EGFR-Konzentration mit zunehmendem Alter geringfügig ab, wobei dieses Ergebnis aufgrund der Streuung um die logistische Regression mit großer Vorsicht betrachtet werden muß. Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung ist zunächst unklar. Dies gilt auch für die Erkenntnis, daß HER-2/neu-negative Patientinnen im FISH-Test statistisch signifikant seltener erniedrigte EGFR-Spiegel ≤ 50 ng/ml aufwiesen ($p=0,044$).

Der s-uPA-Spiegel steigt mit der Tumorlast an und moduliert auch mit dem Remissionsverhalten, wobei allerdings nur die Patientinnen mit kompletter Remission einen statistisch signifikanten Abfall der s-uPA-Konzentration aufzeigten, der sich von den

Gruppen mit PR, SD oder PD unterschied. Die letzten drei Gruppen hatten im Vergleich zueinander keine divergenten Verläufe.

Der beste Bezug zur Tumorlast ergab sich für s-HER-2/neu und CA 27.29, wobei HER-2/neu dem CA 27.29 deutlich unterlegen war. Die mittlere Serumkonzentration von HER-2/neu stieg mit der Anzahl der befallenen Organe und war bei Patientinnen mit viszeralem Befall als Hauptmanifestationsort statistisch signifikant höher (107,2 ng/ml) als bei Patientinnen in der Niedrigrisikosituation mit dominanter Weichteil- (15,5 ng/ml) oder Knochenbeteiligung (16,6 ng/ml; $p=0,01$). Insgesamt fand sich ein erhöhter s-HER-2/neu-Spiegel bevorzugt bei FISH-positiven Patientinnen; die mediane s-HER-2/neu-Konzentration lag bei 67 ng/ml bei Nachweis einer FISH-Positivität und bei 17 ng/ml bei FISH-negativen Patientinnen ($p=0,018$). CA 27.29 stieg statistisch signifikant sowohl mit der Anzahl der befallenen Organe ($p<0,001$) wie auch bei vornehmlichem viszeralem Befall ($p=0,009$) im Vergleich zum nicht-viszeralem Befall an. Während s-HER-2/neu insbesondere beim Erzielen einer Remission über die Zeit hinweg statistisch signifikant abfiel, gab es für den Verlauf von CA 27.29 für alle Möglichkeiten der Remissionsbeurteilung (CR, PR, SD, PD) einen statistisch signifikanten Unterschied nicht nur bezüglich des Zeitverlaufs an sich, sondern auch auf die relativen Unterschiede pro Zeiteinheit, d. h. in bezug auf die Steilheit der Kurven.

Monitoring von Herceptin-Therapien

Nach diesen Ergebnissen zum Monitoring des metastasierten Mammakarzinoms unter systemischer Chemotherapie, aber ohne parallele Behandlung mit dem Antikörper Herceptin, evaluierten wir als nächsten Schritt den s-HER-2/neu-Spiegel von 45 Patientinnen unter einer Kombination von Herceptin plus Chemotherapie oder Herceptin-Monotherapie und verglichen die Behandlungsergebnisse mit dem longitudinalen Verlauf. Insgesamt zeigten 16/45 (35,6%) Patientinnen ein objektives Ansprechen (PR oder CR) auf die Herceptin-Therapie und 14/45 (31,1%) erreichten eine Stabilisierung der Erkrankung, während 15/45 (33,3%) primär progredient waren. Die mittlere baseline s-HER-2/neu-Konzentration lag bei 284,4 ng/ml bei einem Median von 22,4 ng/ml. Die

Wahrscheinlichkeit für ein objektives Ansprechen stieg mit der Ausgangskonzentration von s-HER-2/neu an und lag bei 23,1% für Patientinnen mit einem normalen s-HER-2/neu-Spiegel <15 ng/ml, bei bereits 35,5% für den Bereich von 15-50 ng/ml und stieg auf 46,7% für Patientinnen mit einer Ausgangskonzentration >50 ng/ml. Dies entsprach den Ergebnissen anderer Studiengruppen, erreichte aber aufgrund der naturgemäß eher niedrigen Anzahl an remittierenden Patientinnen keine statistische Signifikanz ($p>0,05$).

Zum Zeitpunkt Woche 2-3 fand sich (noch) keine Beziehung zwischen Therapieergebnis und s-HER-2/neu-Spiegel im Vergleich zur baseline-Konzentration. Für die Woche 3-5 konnte diese Beziehung aber bereits nachgewiesen werden: Fiel die s-HER-2/neu-Konzentration im Vergleich zum Therapiebeginn nicht mindestens auf das 65%-Niveau im Vergleich zu baseline ab, lag die Wahrscheinlichkeit für eine Progression bei 90%. Dieser frühe Hinweis ist hochinteressant, da er vor dem üblichen Kontrollintervall von 8-12 Wochen nach Einleitung der Therapie liegt. Damit kann früher als geplant ein gründliches restaging eingeleitet werden, um der Patientin ggf. die relevanten Nebenwirkungen (Kardiotoxizität) einer wirkungslosen Therapie zu ersparen und nach Umstellung auf eine andere Therapie die gewünschte Kontrolle der Erkrankung zu erreichen.

Konkordanzanalyse unterschiedlicher standardisierter Methoden der HER-2/neu-Bestimmung

Der Nachweis der HER-2/neu-Positivität ist zwingende Voraussetzung für die Einleitung einer Herceptin-Therapie. Hierbei gelten die Immunhistochemie (IHC) sowie die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) als Referenzmethoden. Diskordante Ergebnisse zwischen diesen beiden Methoden wurden in den letzten Jahren vielfach diskutiert, wobei allerdings in keiner Untersuchung eine standardisierte s-HER-2/neu-Messung in das diagnostische Panel integriert wurde. Da die s-HER-2/neu-Messung als einzige Nachweismethode ohne Notwendigkeit einer erneuten Biopsie auch im metastasierten Stadium und damit zum Zeitpunkt der Entscheidung für oder gegen eine Herceptin-Therapie möglich ist, verglichen wir die HER-2/neu-Gewebeergebnisse von IHC und FISH an 61 Gewebeschnitten (Primärtumoren und vereinzelt Metastasen des gleichen Primarius)

miteinander und im zweiten Schritt mit dem s-HER-2/neu-Spiegel zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung. Um den individuellen und subjektiven Einfluß des Untersuchers zu minimieren, wurde hierbei die IHC-Färbung nicht nur manuell, sondern über ein komplexes Hard- und Software-System auch computerisiert beurteilt.

Die automatisierte IHC und die manuelle Befundung zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit 95,1% und einer statistischen Konkordanz der Kategorie "sehr gut". Damit ist die computerisierte HER-2/neu-IHC-Befundung im Rahmen der klinischen Routine insbesondere für Einrichtungen mit hohem Durchsatz zu empfehlen. Die beste Konkordanz (88,5%) von IHC und FISH ergab sich für die automatisierte IHC-Befundung (statistischer Konkordanz-Index der Kategorie "stark"), gefolgt von der Konkordanz zwischen FISH und manueller Befundung durch den Pathologen (83,6%), welche ebenfalls in der Kategorie "stark" lag. Insgesamt kam es bei rund einem Drittel aller Vergleiche der HER-2/neu-Gewebeergebnisse zu divergenten Beurteilungen des HER-2/neu-Status, was für die klinische Praxis als relevant eingeordnet werden muß. Wurde bei diesen problematischen Fällen das IHC-Ergebnis mit dem höchsten Score als Referenz herangezogen, fand man bei 80% der Patientinnen auch einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel, was die Annahme der HER-2/neu-Überexpression als richtig positiv stützte. Die Wahl des höchsten Scores als den repräsentativen Befund erfolgte im Hinblick auf die bestmögliche Sicherheit der Patientin, der auf keinen Fall eine sinnvolle Therapieoption vorenthalten werden durfte.

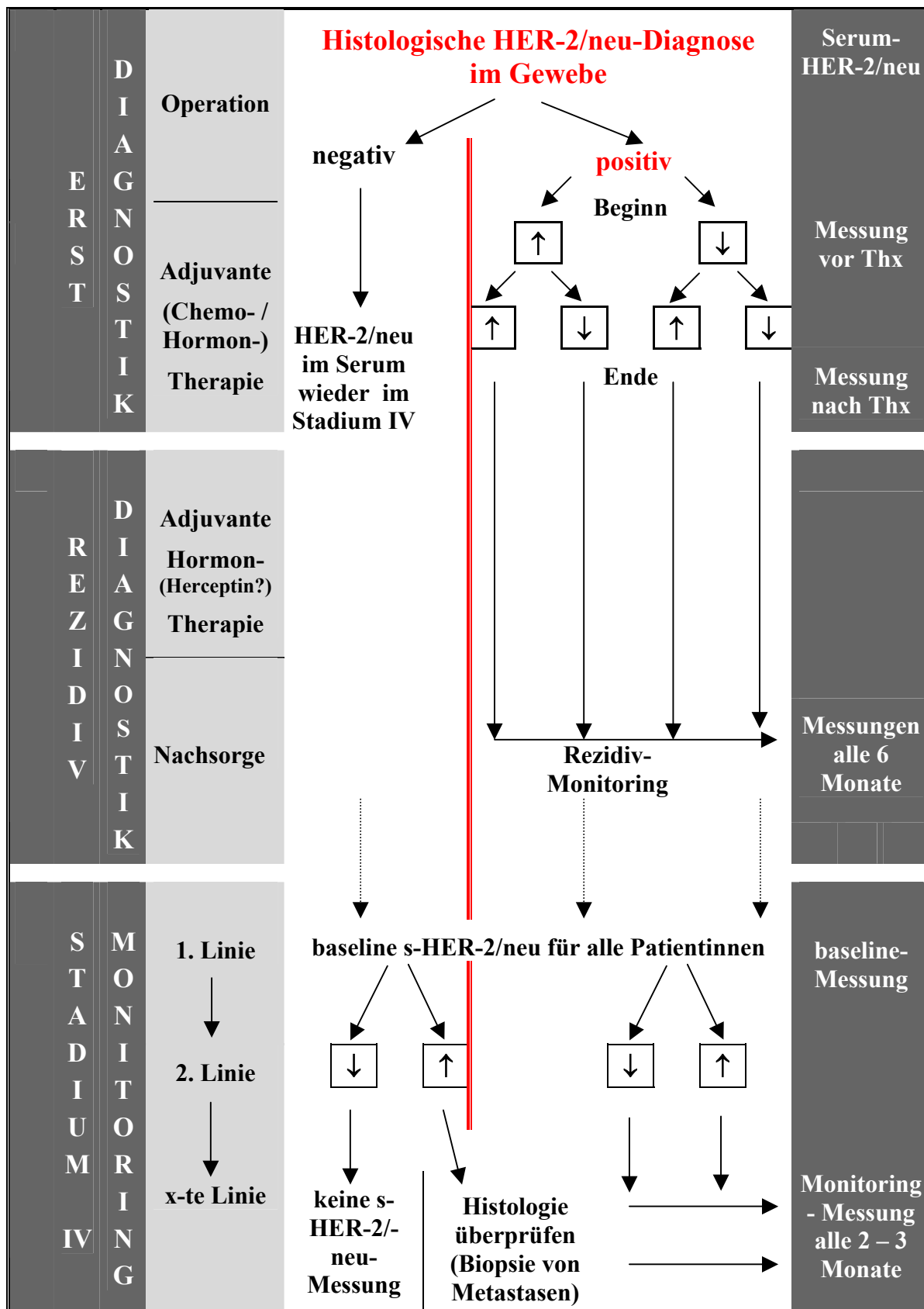
In der Konkordanzanalyse konnten wir nachweisen, daß der s-HER-2/neu-Spiegel von FISH-positiven Patientinnen (Median 67 ng/ml) statistisch signifikant höher ist als von FISH-negativen Patientinnen (Median 17 ng/ml; $p=0,018$). Die Korrelation der metrischen s-HER-2/neu-Ergebnisse und der metrischen ACIS-Computerresultate für die Immunhistochemie ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r=0,50$ ($p=0,007$). Hervorzuheben ist, daß bei HER-2/neu-negativen Patientinnen und erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel dieser niemals höher als 50 ng/ml lag, so daß umgekehrt der Schluß gezogen werden kann, daß Patientinnen mit einem s-HER-2/neu-Spiegel >50 ng/ml mit großer Wahrscheinlichkeit auch eine HER-2/neu-Überexpression am Tumorgewebe aufweisen.

Insgesamt 70% der Patientinnen mit HER-2/neu-negativen Tumoren hatten bei der späteren Fernmetastasierung einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel. Diese Zunahme des Nachweises der HER-2/neu-Positivität zwischen Gewebenachweis am Primärtumor und dem Serumnachweis im Stadium IV ist nicht zufällig ($p=0,001$) und wohl nur teilweise durch den Einfluß der Tumormasse erklärbar. Von wenigen Patientinnen in dieser Konkordanzanalyse standen Gewebeschnitte sowohl vom Primärtumor wie auch von lokoregionären oder Fernmetastasen zur Verfügung, die in Einzelfällen entgegengesetzte HER-2/neu-Ergebnisse erbrachten, ohne daß dies technisch-methodische Ursachen haben konnte. Somit müssen klonale Veränderungen während der Tumorprogression diskutiert werden: Wenige HER-2/neu-positive Zellen eines per definitionem HER-2/neu-negativen Primärtumors könnten aufgrund einer höheren Invasivität bevorzugt (Mikro-)Metastasen setzen und damit eine HER-2/neu-positive, metastasierte Erkrankung verursachen, die sich unter anderem in einem erhöhten HER-2/neu-Serumspiegel niederschlagen würde. Insofern sollte bei Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel und fehlendem Nachweis einer HER-2/neu-Überexpression des Primärtumors eine Gewebetestung von allem verfügbaren und bislang nicht getestetem Tumormaterial angestrebt werden und ggf. bei leicht zugänglichen Tumormanifestationen auch die Biopsie einer Metastase in Erwägung gezogen werden. Untersuchungen, ob Patientinnen mit HER-2/neu-negativem Primärtumor und erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel bei Fernmetastasierung von einer Herceptin-Therapie profitieren könnten, liegen nicht vor.

Algorithmus zur Messung von s-HER-2/neu in Abhängigkeit vom Stadium des Mammakarzinoms und komplementär zur HER-2/neu-Evaluation im Gewebe

Der folgende Algorithmus in Abbildung 1 stellt einen Vorschlag dar, wie die Messung von s-HER-2/neu im klinischen Alltag die Gewebediagnostik von HER-2/neu ergänzen könnte und bei Vermeidung von sinnlosen Untersuchungsanforderungen zur Rezidivdiagnostik und zum Monitoring des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt werden könnte. Dieser Algorithmus beruht weitgehend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, integriert aber auch die Datenlage in der Literatur. Er ist nachfolgend beschrieben und cursorisch ebenso am Ende der Diskussion zusammengefaßt.

Abbildung 1: Algorithmus zum komplementären Einsatz von s-HER-2/neu in der HER-2/neu-Diagnostik (↑ = erhöhter s-HER-2/neu-Spiegel; ↓ = normal niedriger s-HER-2/neu-Spiegel)



Ausgegangen wird von der „klassischen“ Vorgehensweise der primären Operation mit nachfolgender adjuvanter, systemischer Therapie. Für den Fall einer primären, neoadjuvanten Chemotherapie könnte insbesondere die s-HER-2/neu-Bestimmung vor Einleitung der Therapie sinnvoll sein, da unter neoadjuvanter Therapie vereinzelt Veränderungen im HER-2/neu beschrieben wurden. Die hierzu vorliegenden Daten sind allerdings wegen der begrenzten Fallzahlen sehr präliminär. Zudem könnten sich je nach Ergebnis der adjuvanten und neoadjuvanten Therapiestudien mit Herceptin die Empfehlungen für die Initialdiagnostik wie auch für das Rezidivmonitoring ändern.

Bedeutung von s-HER-2/neu in frühen Stadien des Mammakarzinoms

In der adjuvanten Situation hat die Serummessung von HER-2/neu eine deutlich zurückgenommene Bedeutung: Bei der Gesamtheit aller Mammakarzinompatientinnen liegt ohne Berücksichtigung der HER-2/neu-Gewebeexpression die Wahrscheinlichkeit für einen positiven s-HER-2/neu-Spiegel bei rund 5%. Dieser kleine Anteil würde die Messung einer überproportional hohen Anzahl von Proben bis zum Erzielen von relativ wenigen positiven Ergebnissen notwendig machen, was sich wirtschaftlich nicht vertreten läßt. Daher sollte ohne Kenntnis des HER-2/neu-Gewebestatus keine „blinde“ Messung auf HER-2/neu im Serum durchgeführt werden, selbst wenn die prognostische Bedeutung des prätherapeutischen wie auch des posttherapeutischen s-HER-2/neu-Spiegels für eine adjuvante Chemotherapie gesichert wurde. Erst die Kenntnis des HER-2/neu-Gewebestatus, den wir anhand der aktuellen Empfehlungen der Gesellschaften für Pathologie nunmehr bei allen neu diagnostizierten Patientinnen a priori kennen, macht eine individualisierte Diagnostik von HER-2/neu im Serum sinnvoll. Bei einem HER-2/neu-negativen Primärtumor ist die s-HER-2/neu-Messung sinnlos, da man mit großer Wahrscheinlichkeit mit einem negativen Ergebnis rechnen muß, das keinerlei therapeutische Konsequenzen hat. Wir empfehlen daher bei HER-2/neu-gewebenegativen Patientinnen erst wieder im Rezidiv eine s-HER-2/neu-Bestimmung als baseline-Untersuchung.

Bei HER-2/neu-gewebepositiven Patientinnen erscheint eine Basismessung vor Einleitung einer adjuvanten Behandlung und an deren Ende als sinnvoll, da beide Ergebnisse im Falle eines erhöhten Spiegels auf eine schlechte Prognose der Patientin hinweisen. Diese frühen Messungen könnten in den nächsten Jahren zusätzliche Bedeutung erlangen: Zum einen weist die präklinische Datenlage zu HER-2/neu und Herceptin wie auch die Literatur zur adjuvanten Behandlung von soliden Tumoren mit antigenspezifischen Antikörpern im allgemeinen auf einen therapeutischen Nutzen im Sinne eines verlängerten progressionsfreien oder auch Gesamtüberlebens hin, was aktuell beim HER-2/neu-positiven Mammakarzinom in großen klinischen Studien überprüft wird. Zum anderen sind prospektive klinische Studien vor allem mit anthrazyklinbasierten Chemotherapieschemata im Gange, in denen HER-2/neu im Gewebe oder Serum als Selektionskriterium für die Wahl der Chemotherapie geprüft wird.

Diese Empfehlung zur Messung von s-HER-2/neu zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und Behandlungseinleitung des Mammakarzinoms soll nicht im Widerspruch zu den aktuellen Richtlinien der großen Fachgesellschaften zum Einsatz von Tumormarkern stehen, sondern diese vielmehr im Sinne einer individualisierten Diagnostik erweitern und somit vor die individualisierte Therapie plaziert werden. Diese individualisierte Diagnostik ist sicherlich noch „work in progress“ und betrifft zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms die Minderzahl der HER-2/neu-positiven Patientinnen. Die aktuelle Datenlage weist darauf hin, daß die Trefferquote der Rezidivdiagnostik beim HER-2/neu-positiven Mammakarzinom um 80% liegen dürfte und damit die Ergebnisse der klassischen carbohydrate antigen (CA)-Tumormarker nicht nur weit übertrifft, sondern auch umgehende therapeutische Konsequenzen nach sich zieht. Damit macht eine s-HER-2/neu-Messung bei positivem HER-2/neu-Gewebenachweis je nach setting der ambulanten Nachsorge im Abstand von 3-6 Monaten Sinn.

Monitoring durch s-HER-2/neu in der metastasierten Situation

Der hier beschriebene Algorithmus unterstreicht die Bedeutung der s-HER-2/neu-Messung in der palliativen Situation. Hier erscheint die regelmäßige Bestimmung der s-HER-2/neu-

Konzentration bei HER-2/neu-gewebepositiven Patientinnen alle 2-3 Monate unter systemischer Therapie als sinnvoll. Bei einem erhöhten Spiegel sollte s-HER-2/neu als komplementärer Marker zusätzlich zu konventionellen Tumormarkern eingesetzt werden, da er, unter der Annahme einer gewissen Heterogenität der HER-2/neu-Expression im Gewebe, bevorzugt Veränderungen am HER-2/neu-positiven Tumoranteil widerspiegelt, während Tumormarker wie CA 15-3 bzw. CA 27.29 vielmehr die gesamte Tumorlast anzeigen. Unsere Ergebnisse bei Patientinnen unter Herceptin-Therapie zeigen, daß bei gutem Behandlungserfolg im Sinne von mindestens einer guten partiellen Remission der s-HER-2/neu-Spiegel unter den oberen Grenzwert von 15 ng/ml absinkt. Sinkt der Serumspiegel von HER-2/neu innerhalb der ersten 4 Wochen nicht um mindestens 35% im Vergleich zum baseline-Wert ab, muß am Therapieerfolg gezweifelt und ein frühes restaging eingeleitet werden.

Bedeutung des shedding-Prozesses

Bei Mammakarzinompatientinnen mit Überexpression von HER-2/neu im Gewebe und negativem s-HER-2/neu-Spiegel bei Erstmanifestation der fernmetastasierten Erkrankung (ca. 20% der HER-2/neu positiven Patientinnen im Stadium IV) findet aus nur bedingt aufgeklärten Ursachen kein shedding statt. Es ist bekannt, daß eine erfolgreiche Behandlung mit Herceptin zu einem verminderten shedding mit Absinken des HER-2/neu-Spiegels im Serum führt, während eine zunehmend autonome, unbeeinflussbare Erkrankung mit einem vermehrten shedding und ansteigenden s-HER-2/neu-Spiegel einhergeht. Dies könnte zu einem circulus vitiosus führen: Mit Verlust der extrazellulären Bindungsstelle für Herceptin durch den shedding-Prozeß dürfte diese Behandlungsoption keine Chance mehr auf Erfolg haben. Gleichzeitig steht der verbleibende intrazelluläre Rezeptoranteil von HER-2/neu weiterhin für die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie zur Verfügung. Dies erklärt, warum ein initial niedriger Serum-HER-2/neu-Spiegel bei späterem Anstieg über die obere cut-off-Grenze einerseits ein Zeichen für eine Tumorprogression ist, andererseits wahrscheinlich die Patientin in eine ungünstigere Prognosegruppe einordnet. Die eigenen Ergebnisse zeigen an, daß selbst Patientinnen mit fehlender HER-2/neu-Expression im Gewebe und

initial negativem s-HER-2/neu-Spiegel gegen Ende der Tumorerkrankung zur HER-2/neu-Serumpositivität konvertieren können. Dies muß als höchst ungünstiger Faktor interpretiert werden, da in dieser Situation trotz geringer HER-2/neu-Expression die Tumormasse so hoch wird, daß ein erhöhter Spiegel gemessen wird.

Diskordanzen zwischen HER-2/neu-Gewebestatus und s-HER-2/neu-Befund

Die komplementäre Bedeutung der Serumtestung auf HER-2/neu wird am deutlichsten bei Patientinnen, die bei Erstdiagnose einen negativen Befund in der HER-2/neu-Gewebetestung aufwiesen. Es ist davon auszugehen, daß 10-20% aller Mammakarzinome einen Wechsel der HER-2/neu-Expression im Erkrankungsverlauf durchmachen. Ursache könnten klonale Veränderungen sein, auf welche die hohen Nachweisraten von HER-2/neu von bis zu 68% bei minimal residual disease hinweisen. Auch der hohe Anteil an s-HER-2/neu-gewebepositiven und HER-2/neu-gewebenegativen Patientinnen von rund 40% in unserer Untersuchung deutet in die gleiche Richtung. Diese Zahlen könnten einem Selektionsmechanismus von wenigen HER-2/neu-positiven Zellen in einem insgesamt HER-2/neu-negativen Gewebe hinein in die deutliche HER-2/neu-Positivität der späteren, metastasierten Erkrankung entsprechen.

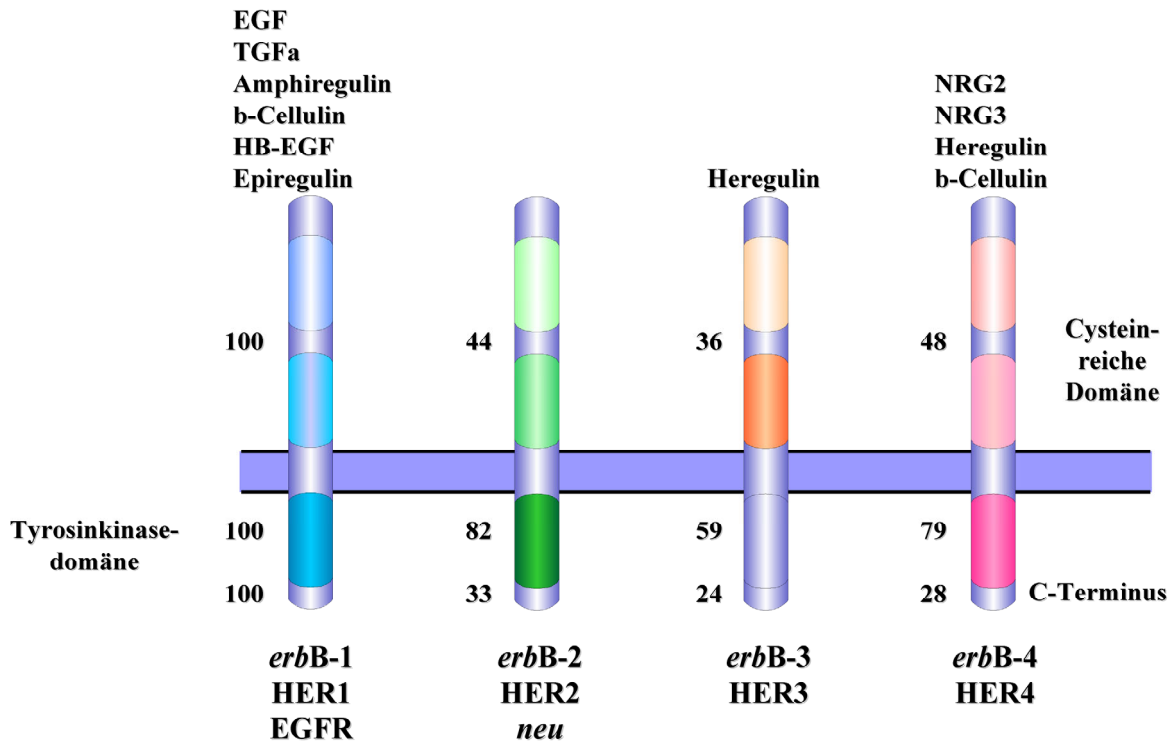
Zusätzlich zu diesen klonalen Veränderungen unterliegt die HER-2/neu-Expression multiplen regulativen Prozessen. Dies belegen die eigenen Ergebnisse aus der Table-Studie unter hormoneller Ablation, aber auch die Resultate zur Veränderung der HER-2/neu-Expression zwischen Drillbiopsie und Tumorresektat nach neoadjuvanter Chemotherapie. Hier erlaubt die Serumtestung auf HER-2/neu als einzige Testmethode eine Beurteilung direkt zum Zeitpunkt einer anstehenden Therapieentscheidung. Die HER-2/neu-Expression ist somit durchaus ein dynamisches Geschehen, wenngleich eine Veränderung des HER-2/neu-Status im Verlauf der Erkrankung nur für eine Minderheit aller Patientinnen zutrifft.

2. Einleitung

Die Aktivierung zellulärer Onkogene spielt bei der Entstehung von malignen, soliden Tumoren eine wichtige Rolle. Für die Pathophysiologie und Therapie des Mammakarzinoms wurde das Onkogen HER-2/neu (Synonym: c-erbB-2), ein Mitglied der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren (epidermal growth factor receptor = EGFR family) als besonders wichtig identifiziert (1;2). Dieses transmembranöse Protein wird in epithelialen Zellen exprimiert und vermittelt seine Wirkung nach intrazellulär durch Autophosphorylierung von Tyrosinseitenketten. Der vollständige Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 185 kDa (p185) und setzt sich aus 3 Domänen zusammen: dem intrazellulären, C-terminalen Anteil, welcher mit der ihm eigenen Tyrosinkinase-Aktivität durch Autophosphorylierung die Signaltransduktion initiiert, einem transmembranösen Abschnitt sowie der extrazellulären Domäne (ECD), welche mehrfach glykosyliert ist.

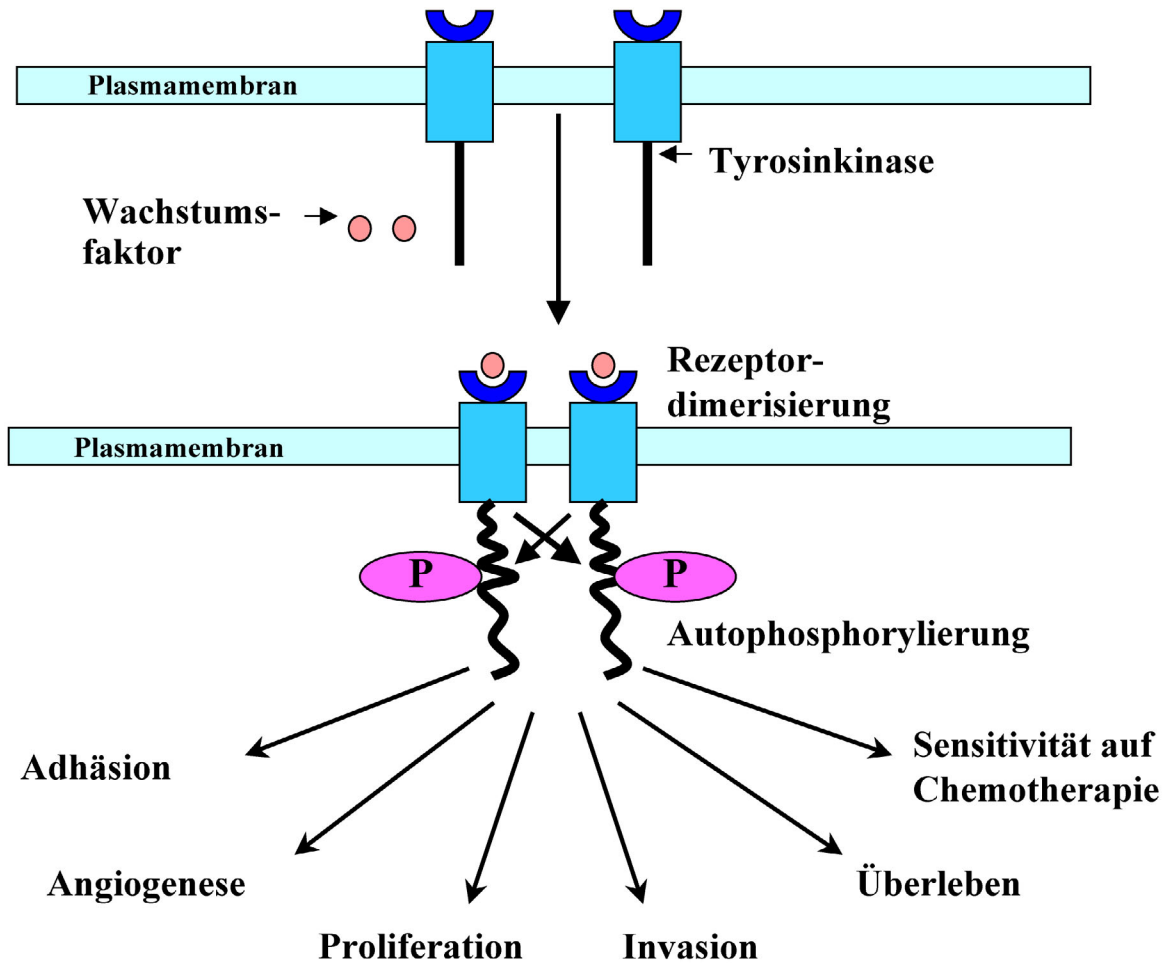
Die verschiedenen Mitglieder der EGFR-Familie zeigen untereinander eine hohe strukturelle Homologie (3;4). Abbildung 2 zeigt die Verwandtschaft zwischen den 4 Mitgliedern dieser Onkogenfamilie in Bezug auf die 3 geschilderten Rezeptoranteile und auch die identifizierten Liganden. Es fällt auf, daß gerade die intrazelluläre Domäne die höchste Übereinstimmung zwischen den Rezeptorsubtypen aufweist, was sich mit dem Ziel der Bewahrung der Tyrosinphosphorylierung als Hauptfunktion erklären läßt. Die verschiedenen Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie sind in der Lage, untereinander gleichsinnige oder auch gemischte Paare im Sinne von Homo- und Heterodimeren zu bilden (siehe Abbildung 2). Durch diese Dimerisierung können auch Rezeptoren aktiviert werden, wenn nur an einen der Partner ein Ligand anbindet. Somit können auch defiziente Rezeptoren noch Signale in den Intrazellularraum weitergeben, wenn sie die extrazelluläre Domäne als eigentliche Ligandenbindungsstelle verloren haben (5;6). Es ist bislang nicht eindeutig bekannt, wie der relative Anteil der verschiedenen Mitglieder der EGFR-Familie und damit die Möglichkeit zur Ausbildung von Dimeren das Wachstum eines Tumors und seine therapeutische Beeinflußbarkeit bedingt.

Abbildung 2: Strukturhomologie zwischen den 4 Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie. Die Struktur des EGF-Rezeptors wird hierbei als Referenz mit 100% Identität definiert (3).



Nach proteolytischen Prozessen durch Metallomatrixproteasen wird die ECD abgespalten und in die Blutbahn freigesetzt (7-9). Insbesondere eine sehr hohe Aktivität dieser Reaktion könnte erhebliche Konsequenzen für den weiteren Krankheitsverlauf und die therapeutische Beeinflussbarkeit einer individuellen Patientin mit Mammakarzinom haben: Zum einen geht mit der Abspaltung des extrazellulären Rezeptoranteils die Bindungsstelle für den monoklonalen anti-HER-2/neu-Antikörper Herceptin verloren. Zum anderen verbleibt der intrazelluläre Anteil des Rezeptors, der weiterhin über die Heterodimerisierung mit anderen Familienmitgliedern aktiviert werden kann (siehe Abbildung 3). Insbesondere Patientinnen mit einem hohen HER2/neu-Serumspiegel (>100-200 ng/ml) werden daher einer sehr ungünstigen Risikokategorie zugesprochen, ohne daß bislang harte Daten an einer ausreichend großen Patientinnenanzahl in der Literatur publiziert sind.

Abbildung 3: Bildung von Dimeren zwischen verschiedenen Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie und ihre biologischen Effekte nach Aktivierung von Signaltransduktionssystemen



HER-2/neu wird als epitheliales Protein in vielen Organen exprimiert (zum Beispiel Mamma, Lunge, Kolon, Prostata, Harnblase) und ist damit weder geschlechts-, organ- noch erkrankungsspezifisch (10). Daher kann HER-2/neu in geringen Konzentrationen im Serum gesunder Frauen und Männer nachgewiesen werden. Während sich der normale HER-2/neu-Rezeptorbesatz einer gesunden epithelialen Zelle auf ca. 100.000 Rezeptoren/Zelle beläuft, kann diese Dichte auf das 30-40-fache im Falle der Überexpression bei einer epithelialen Tumorzelle erhöht sein (11). Erhöhte HER-2/neu-Serumwerte werden vereinzelt bei Frauen bei Erstdiagnose eines Mammakarzinoms nachgewiesen, überwiegend aber bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom. Während das membrangebundene HER-2/neu-Protein bei ca. 25-30% der primären Mammakarzinome überexprimiert ist, wurde die abgespaltene ECD des Rezeptors von

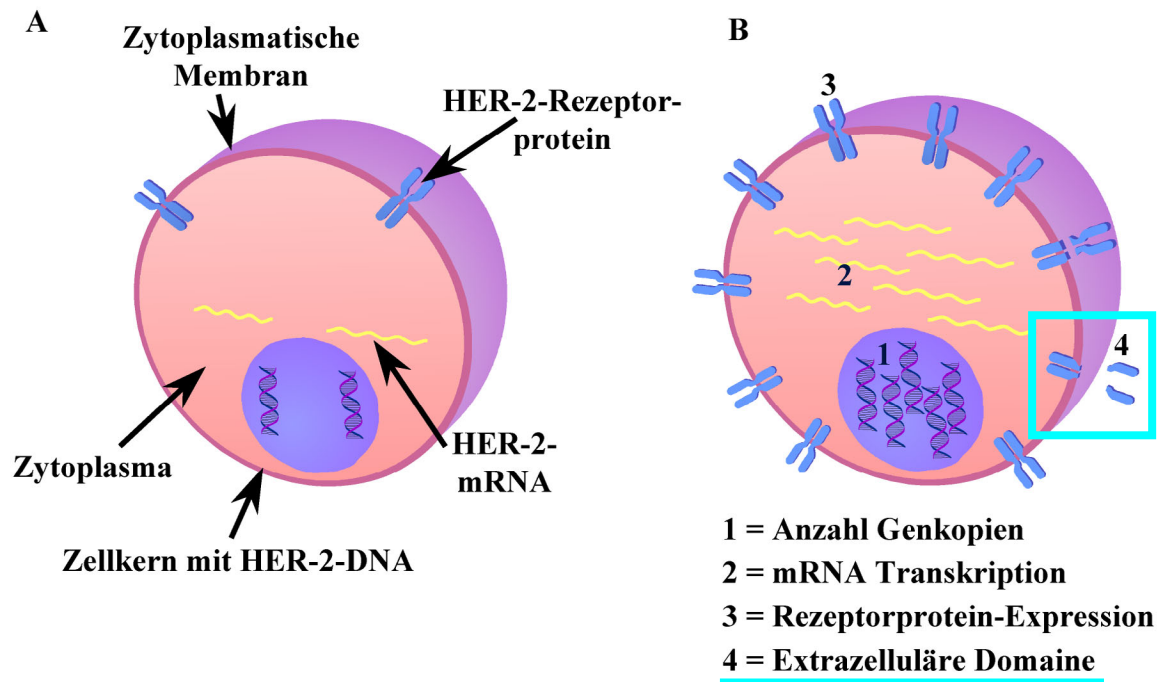
mehreren Studiengruppen bei mehr als 50% der Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung als erhöht gemessen (12-15).

Es gibt mehrere Nachweismöglichkeiten für HER-2/neu (siehe Abbildung 4). Als Referenzstandard und klinisch praktikable Methode wird derzeit die Immunhistochemie (IHC) angesehen (16;17). Hierfür liegt eine nach DAKO® standardisierte und in einem semiquantitativen Score auszuwertende Methode vor, die auch für die immunhistochemischen HER-2/neu-Färbungen in unseren nachfolgend aufgeführten Untersuchungen angewandt wurde. Der Nachweis der mRNA-Transkriptionsrate gilt bislang als experimentell (18;19). Eine Standardisierung, die den Vergleich von Daten zwischen den Labors möglich machen würde, liegt nicht vor. Die wohl mit der besten Sensitivität und Reliabilität praktizierte Methode ist die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), die allerdings technisch sehr aufwendig ist, eine komplexe Laborausstattung notwendig macht und nur vom geübten Untersucher auszuwerten ist (20-22). Die bislang in internationalen Studien zu Herceptin am wenigsten beachtete Methode ist der Nachweis der ECD von HER-2/neu im Serum. Nachteilig für eine unvoreingenommene wissenschaftliche Beurteilung war in diesem Zusammenhang, daß die wenigen Daten zu s-HER-2/neu aus den Herceptin-Zulassungsstudien mit einem nicht-standardisierten Test erhoben wurden, der üblichen Gütekriterien nicht standhält (23;24). Es sollte berücksichtigt werden, daß es sich bei der Serumbestimmung von HER-2/neu um die einzige Methode handelt, die den HER-2/neu-Status zu jedem beliebigen Zeitpunkt erlaubt und nicht auf Archivmaterial zurückgreifen muß.

Während die prognostische Bedeutung des immunhistochemischen Nachweises von HER-2/neu bereits in den Erstbeschreibungen gut dargestellt wurde und die prädiktive Wertigkeit für den Erfolg einer Herceptin-Therapie wohl mit der Methode der Immunhistochemie wie auch mit der FISH-Untersuchung klar belegt werden konnte, bleibt der Stellenwert der Serumuntersuchung auf HER-2/neu spärlich untersucht und in bezug auf seine Komplementarität zu den anderen Nachweismethoden unklar. Es ist das Ziel dieser Habilitationsschrift, die prognostische und prädiktive Bedeutung von s-HER-2/neu für die verschiedenen Stadien des Mammakarzinoms unter verschiedenen systemischen

Therapieformen in der adjuvanten wie auch in der fernmetastasierten Situation darzustellen.

Abbildung 4: Nachweismethoden der HER-2/neu-Überexpression. A: Normale Epithelzelle; B: HER-2/neu-überexprimierende Zelle.



3. Fragestellungen

Als Voraussetzung für die Untersuchungen zur prognostischen und prädiktiven Bedeutung von s-HER-2/neu, zur Abgrenzung von anderen biochemischen Faktoren und zum Nachweis seines ggf. unabhängigen Einflusses mußten zunächst die cut-off-Werte für das interessierende Panel an biochemischen Faktoren bestimmt werden. Hierzu wurden im ersten Schritt im monozentrischen Setting die Serumspiegel von HER-2/neu, CA 27.29, EGFR und uPA von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit denen von gesunden Kontrollen verglichen. Im Rahmen einer multizentrischen Untersuchung wurde der obere cut-off-Wert für s-HER-2/neu zudem durch einen Vergleich mit Frauen mit benigner Brusterkrankung bestätigt. Insgesamt wurde s-HER-2/neu mit drei verschiedenen Immunoassays bestimmt.

Als nächster Schritt sollte die prognostische Bedeutung von s-HER-2/neu im Rahmen einer multizentrischen, prospektiv randomisierten Studie untersucht werden, die das GnRH-Analogon Leuprorelin im Vergleich zu einer CMF-Chemotherapie testete. Hierbei galt es auch, ggf. vorhandene regulative Mechanismen von HER-2/neu durch Veränderungen des Östrogeneinflusses während der ovariellen Ablation aufzuzeigen. Hinweise hierfür lagen in der Literatur vor allem aus *in vitro*-Untersuchungen vor. Diese Betrachtung schien auch zur erneuten Bestätigung des oberen cut-off-Wertes von s-HER-2/neu als sinnvoll.

In bezug auf die metastasierte Situation sollte zunächst die prädiktive Bedeutung von s-HER-2/neu für eine Behandlung mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel (Schema: 90 mg/m² wöchentlich x6, q9w) untersucht werden. Hierfür korrelierten wir die verschiedenen Parameter des klinischen Ansprechens mit den baseline-Spiegeln von s-HER-2/neu. Zudem wurde die Eignung von s-HER-2/neu als Monitoring-Parameter untersucht. Das Konzept dieser dosisintensivierten Paclitaxel-Monotherapie erschien für diese Fragestellungen sehr geeignet.

Nach der Darstellung der prädiktiven Bedeutung von s-HER-2/neu für die Paclitaxel-Therapie sollte als nächstes das übergeordnete Prinzip der prädiktiven Bedeutung von s-HER-2/neu hinterfragt werden. Hierfür wurde die Fragestellung losgelöst vom selektierten

Studiendesign wie in der Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel. Stattdessen wurde ein gemischtes Patientinnenkollektiv unter unterschiedlichen Formen von Chemotherapie und nach diverser Vorbehandlung betrachtet. Diese Gruppe entspricht dem allgemeinen Patientinnengut aus der täglichen Praxisroutine. Um den unabhängigen Einfluß von s-HER-2/neu darzustellen, wurde für diese Analyse ein Panel von biochemischen Markern berücksichtigt, die in den letzten Jahren als potentiell bedeutungsvoll identifiziert worden waren. Dies waren im einzelnen: CA 27.29 (entsprechend dem CA 15-3) als konventioneller Tumormarker, EGFR als weiteres Mitglied der epidermal growth factor receptor-Familie sowie uPA als Indikator der Destruktion der Interzellulärsubstanz.

Hohe Aufmerksamkeit wurde der Verlaufsbeurteilung durch all diese biochemischen Faktoren gewidmet. Dies galt umso mehr unter dem Aspekt, daß gegen alle ausgewählten Marker in den letzten Jahren spezifische Therapieformen entwickelt wurden. So ist CA 27.29 ein wichtiges Antigen im Rahmen von Vakzinierungstechniken, EGFR das Target von Signaltransduktionshemmern wie ZD 1839 (Iressa®) und OSI-774 (Tarceva®), HER-2/neu der Zielrezeptor von Herceptin. Auch gegen das uPA/PAI-1-System werden gerichtete Substanzen entwickelt. Daher versuchten wir, für jeden dieser Marker Unterschiede zwischen den longitudinalen Verläufen der einzelnen Remissionsgruppen (partielle oder komplette Remission, stabile Erkrankung, primäre Progression) herauszuarbeiten. Dabei berücksichtigten wir den Zeiteffekt von baseline zu den jeweiligen Verlaufszeitpunkten innerhalb einer Remissionsgruppe (zum Beispiel entsprechend dem relativen Unterschied von Behandlungsbeginn zum ersten restaging für die Gruppe der Patientinnen mit partieller Remission), Unterschiede zwischen den Gruppen (zum Beispiel den relativen Abfall eines Markers von baseline bis zum ersten restaging für die Patientinnen mit partieller Remission im Vergleich zu den Patientinnen mit kompletter Remission) wie auch die Ausrichtung und Steilheit dieser Verläufe.

Für die Patientinnen unter Herceptin-Therapie wurde aufgrund der aktuellen Datenlage die Monitoring-Fragestellung anders formuliert und entsprechend ein anderer statistischer Ansatz der Auswertung notwendig. Bei Ansprechen auf eine Herceptin-Therapie wurde im Vergleich zu konventionellen Tumormarkern ein sehr schneller Abfall der s-HER-2/neu-

Konzentration innerhalb der ersten 2-4 Wochen nach Therapiebeginn beobachtet. Insofern war die klinisch relevante Frage, um wieviel der s-HER-2/neu-Spiegel in welchem Zeitraum abfallen muß, um Patientinnen mit klinischem Benefit mit ausreichender Sicherheit von Patientinnen mit primärer Progression unterscheiden zu können und bei dieser Untergruppe ein frühes restaging einzuleiten. Ein solches Vorgehen könnte helfen, wirkungslose Therapien mit ggf. relevanten Nebenwirkungen frühzeitig einzustellen, um andere Wege der Erkrankungskontrolle zu beschreiten und dabei gleichzeitig Kosten einzusparen. Neben diesen frühen Veränderungen im Vergleich zum Behandlungsbeginn wurde für langfristige Behandlungen bei Patientinnen mit Stabilisierung oder Remission der Erkrankung gefragt, ob der s-HER-2/neu-Spiegel unter den oberen cut-off von 15 ng/ml abfällt.

Im Rahmen all dieser Untersuchungen fiel das Phänomen auf, daß Patientinnen trotz negativem HER-2/neu-Status in den Gewebeuntersuchungen (sowohl Immunhistochemie wie auch FISH) in der metastasierten Situation einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel aufweisen können. Dies forderte dazu auf, eine Konkordanzanalyse verschiedener Methoden zur HER-2/neu-Bestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung durchzuführen. Das Ziel bestand darin, das Ausmaß und ggf. die technischen und/oder biologischen Ursachen dieser Diskordanzen abzugrenzen, da diese insbesondere die Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms relevant beeinflussen könnten.

Als Ausgangspunkt wurde an 101 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom der s-HER-2/neu-Status bestimmt und in Bezug zur Immunhistochemie des Primärtumors gesetzt. Als nächstes wurde bei 30 Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung der HER-2/neu-Status im primären Mammakarzinomgewebe mittels zunächst noch nicht standardisierten Methoden der Immunhistochemie bestimmt und später mit der standardisierten Immunhistochemie nach DAKO und durch die Anzahl an Genkopien mittels FISH ergänzt. Die immunhistochemischen Schnitte wurden dabei auf dem klassischen Wege durch den Pathologen unter dem normalen Lichtmikroskop begutachtet, aber auch einer automatisierten Beurteilung durch ein Computersystem zugeführt. Dadurch konnte der subjektive Einfluß des Befunders minimiert werden. In diese Analyse gingen, sofern vorhanden, neben dem Primärtumor auch Schnitte von synchronen

Lymphknotenmetastasen oder metachronen Fernmetastasen derselben Patientinnen ein. Dies ermöglichte den Vergleich der Gewebeergebnisse des Primärtumors und seiner Metastasen mit den Serumergebnissen zum Zeitpunkt der metastasierten Situation.

Zusammenfassend hinterfragten wir den prognostischen und/oder prädiktiven Nutzen der s-HER-2/neu-Messung zu unterschiedlichen Stadien des Mammakarzinoms und die komplementäre Bedeutung des s-HER-2/neu-Status im Vergleich zur HER-2/neu-Proteinexpression oder Genamplifikation im Gewebe. Falls sich klinisch relevante Informationen herausarbeiten lassen sollten, wollten wir diese in einen Algorithmus zur Bedeutung von s-HER-2/neu in der Gesamtbehandlung des Mammakarzinoms einarbeiten, um dem Kliniker begründete Empfehlungen für die tägliche Praxis an die Hand zu geben und sinnlose Bestimmungen zu vermeiden.

4. Material und Methoden

4.1. Gesunde Referenzkollektive gemäß Blutspenderkriterien

Zur Definition der cut-off-werte für s-HER-2/neu, CA 27.29, s-EGFR und s-uPA mußte jeweils ein Kollektiv von Mammakarzinompatientinnen in der fortgeschrittenen Erkrankungssituation mit einem gesunden Referenzkollektiv verglichen werden. Dies erfolgte zunächst monozentrisch an der Charité für die manuellen Enzymimmunoassays und wurde in der Folge in einer multizentrischen Untersuchung zur s-HER-2/neu-Bestimmung auf dem klinisch-chemischen Analysenapparat Immuno 1[®] bestätigt.

4.1.1. Monozentrische Untersuchungen

Im Rahmen der monozentrischen Bestimmungen zu den cut-off-Bereichen der verschiedenen Serumparameter wurde von gesunden Frauen, welche die allgemeinen Kriterien von Blutspendern erfüllten (keine akute oder chronische Erkrankung, keine Impfung innerhalb der letzten 3 Monate, keine Einnahme von Medikamenten, keine Infektions- oder maligne Vorerkrankung), eine 10 ml-Serummonovette venöses Blut abgenommen. Dieses wurde bei 500 g zentrifugiert und der Überstand in 3-4 aliquots à 1,5 ml in Plastikgefäßen bei -30 °C eingefroren. Nach Auftauen für Messungen wurden die benutzten aliquots markiert, um bei Folgemessungen keine freeze-and-thaw-Effekte zu übersehen.

Das Kontrollkollektiv für die s-HER-2/neu-Bestimmungen bestand aus n=54 Patientinnen. Für die cut-off-Bestimmungen von s-EGFR- und s-uPA konnten wir das Vergleichkollektiv auf n=76 erweitern.

4.1.2. Multizentrische Untersuchung für automatisierten s-HER-2/neu-Assay

Für die Untersuchung zu s-HER-2/neu mit dem voll automatisierten Immuno 1-s-HER-2/neu-Assay wurden alle Seren von Patientinnen und Kontrollen im Rahmen einer multizentrischen Studie an insgesamt 3 Zentren gewonnen. Unsere Studiengruppe war maßgeblich an der Auswertung und Publikation der Resultate beteiligt (25).

Ähnlich wie für die monozentrische Studie wurde für den Immuno 1-Analysenapparat der obere cut-off für s-HER-2/neu als die niedrigste Serumkonzentration definiert, welche 95% der Serumspiegel eines Kontrollkollektivs aus gesunden prä- und postmenopausalen (jeweils n=121) Frauen gerade überschritt. Auch für diese Frauen galten die üblichen Kriterien für gesunde Blutspender, ergänzt durch eine leere Anamnese bezüglich benigner Brusterkrankungen. Die Altersverteilung in dieser gesunden Vergleichsgruppe war wie folgt: n=12 < 25 Jahre; n=100 von 25-45 Jahren; n=54 von 46-60 Jahren; n=76 >60 Jahre.

Das Kollektiv zur Bestimmung der Spezifität des Immuno 1-s-HER-2/neu-Tests für das Mammakarzinom setzte sich zusammen aus 280 gesunden Frauen (inklusive der gerade erwähnten 242 Patientinnen zur cut-off-Bestimmung), 100 Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen und 110 Frauen mit anderen, nicht-malignen Erkrankungen ohne Beteiligung der Brustdrüse. Zu den benignen Brusterkrankungen zählten Mikrokalk, Mastalgie, Mastitis, duktale Hyperplasie oder Ektasie, apokrine Metaplasie, Adenome, Fibroadenome mit oder ohne Zysten und Papillome. Unter den nicht-malignen Erkrankungen standen chronische Lebererkrankungen wie Leberzirrhose oder Hepatitis, rheumatoide Arthritis, verschiedene Lungenerkrankungen und chronische Infektionserkrankungen im Vordergrund.

Die Sensitivität des Immuno 1-Assays wurde mit den s-HER-2/neu-Ergebnissen von 204 Mammakarzinompatientinnen in den Stadien I-IV der Erkrankung bestimmt. Für die Stadien I-III erfolgte die Blutentnahme vor der Primäroperation und der Einleitung einer systemischen Therapie. Alle tumorspezifischen und pathologischen Angaben sowie die Therapiedaten zum Probenzeitpunkt lagen vor. Die Proben zum Stadium IV wurden zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung abgenommen.

4.2. Patientinnenkollektiv in den Stadien I-III: Table-Studie

Die prognostische Bedeutung von Serum-HER-2/neu sollte an einem Patientinnenkollektiv unter adjuvanter Behandlung im Rahmen der sogenannten Table-Studie untersucht werden. In dieser prospektiv randomisierten Phase III-Studie wurden die Wirksamkeit und Sicherheit einer 2-jährigen, postoperativen, hormonablativen Therapie mit Leuprorelinacetat im Vergleich zu einer adjuvanten Chemotherapie nach dem CMF-Schema (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil) untersucht.

Die Rekrutierungskriterien für diese nach GCP-Kriterien durchgeführte und von der Ethikkommission der Charité zustimmend geprüfte Studie waren wie folgt:

Einschlußkriterien: histologisch gesichertes Mammakarzinom nach Primäroperation; Alter >18 Jahre; prämenopausale Patientin gemäß FSH-Status; Behandlungsbeginn innerhalb von 6 Wochen nach Operation; postoperative Beurteilung der Tumorgroße als T1-3; Metastasierung in die lokoregionären Lymphknoten, wobei 1-9 von mindestens 10 untersuchten Lymphknoten befallen sein sollten; Ausschluß einer Fernmetastasierung; positiver Östrogenrezeptorstatus; adäquate, nicht-hormonelle Kontrazeption während der Therapie; negativer Schwangerschaftstest; Therapiebeginn nicht während einer Stillphase; guter Allgemeinzustand; keine relevanten chronischen Erkrankungen; keine relevanten Abnormalitäten in klinischen und Laboruntersuchungen; schriftlicher informed consent.

Ausschlußkriterien: medikamentöse Krebstherapie innerhalb der letzten 6 Monate; Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb der letzten 30 Tage; endokrine Störung; Herzinsuffizienz \geq NYHA III; chronische Steroidtherapie; begleitende Antibiotikatherapie; Serumkreatinin \geq 1,5 mg/dl; Zustand nach bilateraler Ovariectomie, Radiomenolyse, Adrenalectomie oder Hypophysektomie; chronische Einnahme von Phenothiazin; Einnahme von Hormonen, Reserpin, α -Methyldopa in den letzten 2 Wochen vor Studienbeginn.

Die Randomisierung erfolgte in 2 Therapiearme: Die Kontrollgruppe erhielt eine CMF-Chemotherapie mit Cyclophosphamid 500 mg/m² an den Tagen 1 und 8, Methotrexat 40 mg/m² an den Tagen 1 und 8 und 5-Fluorouracil 600 mg/m² ebenfalls an den Tagen 1 und 8. Insgesamt wurden planungsmäßig 6 Zyklen im Abstand von 28 Tagen verabreicht. Im

Untersuchungsarm wurden die Patientinnen alle 3 Monate mit Leuprorelinacetat in Form einer subkutanen Depotinjektion und einer Dosis von 11,25 mg behandelt. Diese Therapie wurde bis zum Rezidiv, maximal aber über 2 Jahre, fortgesetzt.

Als primäres Zielkriterium für die Beurteilung der *Wirksamkeit* wurde die Anzahl der nach 2 Jahren rezidivfrei Überlebenden zwischen den beiden Gruppen verglichen unter der Ausgangshypothese, daß die beiden Therapieformen äquieffektiv sind. Als weitere Endpunkte wurden das rezidivfreie und das Gesamtüberleben nach Kaplan-Meier überprüft.

Die *Nachsorge* der Patientinnen erfolgte im üblichen Modus mittels Anamnese, eingehender körperlicher Untersuchung inklusive EKG sowie bildgebenden Verfahren (Röntgen Thorax, Sonographie Abdomen, Skelettszintigramm und andere entsprechend klinischer Notwendigkeit). Das Rezidiv des Mammakarzinoms galt als gesichert, wenn bei einem Lokalrezidiv ein positiver zytologischer oder histologischer Befund erhoben wurde. Fernmetastasen wurden mittels Bildgebung diagnostiziert.

Zur Dokumentation des *endokrinen Status* (LH und Östradiol bei allen Patientinnen, zusätzlich FSH und Leuprorelinacetat bei den deutschen Patientinnen) waren im Protokoll regelmäßige Blutentnahmen in folgenden Zeitabständen vorgesehen: Monat 0 (= baseline), Monat 3, Monat 6 (= Ende der CMF-Chemotherapie), Monat 12, Monat 18 und Monat 24 (= Ende der Leuprorelin-Therapie). Alle Patientinnen wurden endokrinologisch nachbeobachtet, bis sie sicher postmenopausal ($\text{FSH} \geq 50 \text{ U/l}$) waren. Ein Wiedereinsetzen der Menstruation wurde dokumentiert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden zudem das Blutbild mit Differentialblutbild, der Quick-Wert und übliche Parameter der Standardserumchemie bestimmt.

Im Rahmen der Table-Studie wurde das Material wie folgt aufgearbeitet: Nach dem Ausgerinnen wurden 10 ml Vollblut zentrifugiert, das gewonnene Serum abdekantiert, beschriftet, bei -20°C eingefroren und in batches in ein Zentrallabor geschickt, wo es in der Folge bei -80°C gelagert wurde. Für die *HER-2/neu-Bestimmungen* stand der Arbeitsgruppe jeweils ein aliquot Serum zur Verfügung. Zusätzlich zu HER-2/neu wurde

auch CA 27.29 bestimmt. Aus den Seren der Table-Studie wurde HER-2/neu anhand der hohen Probenzahl auf der automatisierten Plattform Immuno 1 getestet (Methodik siehe 4.1.2). Jede 10. Probe wurde im gleichen Auftauvorgang parallel mit dem manuellen Oncogene®-Test gemessen, um die Korrelation zwischen den beiden Verfahren zu untersuchen.

4.3. Patientinnenkollektive im Stadium IV zur Verlaufsbeobachtung

Insgesamt untersuchten wir 3 verschiedene Patientinnenkollektive mit metastasiertem Mammakarzinom: Patientinnen aus einer Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel als Zweit- oder Mehrlinientherapie, ein gemischtes Patientinnenkollektiv unter unterschiedlichen Formen und Linien der Chemotherapie sowie ein drittes Kollektiv unter einer Herceptin-basierten systemischen Behandlung.

4.3.1. Wöchentlich fraktioniertes Paclitaxel als Zweit- oder Drittlinientherapie

Die ersten longitudinalen Daten zu HER-2/neu im Serum wurden im Rahmen einer Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem, dosisintensivierten Paclitaxel erhoben. Insgesamt war für diese Studie eine Fallzahl von 50 Patientinnen errechnet worden, wobei das Amendment für die Serum-HER-2/neu-Begleituntersuchung ab der Patientin 11 aktiviert wurde.

Bei der Studie handelte es sich um eine monozentrische Untersuchung mit folgenden Rekrutierungsrichtlinien: *Einschlußkriterien:* Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom mit evaluierbarer Erkrankung (Größenbestimmung definierter Referenzmetastasen, Verlaufsbeobachtung von Ergüssen); zytostatische palliative Vorbehandlung (Versagen einer anthrazyklinhaltigen Therapie; bei Kontraindikationen gegen Anthrazykline auch Erstlinientherapie möglich); Karnofsky-Index $\geq 70\%$;

ausreichende Knochenmarksreserve; Alter 18-80 Jahre; geschätzte Lebenserwartung >12 Wochen; Fähigkeit, Inhalt und Konzept der Studie zu verstehen; schriftliche Einverständniserklärung. *Ausschlußkriterien:* bekannte Allergie gegen Paclitaxel oder einen Bestandteil der Zubereitung; vorbestehende, periphere Neuropathie; Knochenmarkinsuffizienz (Leukozyten <3000/ μ l, Hb <6,7 mmol/l, Thrombozyten <100.000/ μ l); schwere kardiale Begleiterkrankungen; klinisch relevante Leber- oder Nierenfunktionsstörungen (Bilirubin >2-fache der oberen Norm und/oder ALAT >3-fache der oberen Norm; bei Lebermetastasierung keine Transaminasenerhöhung >5-fache der oberen Norm; Kreatinin oder Harnstoff >1,5-fache der oberen Norm); Schwangerschaft oder Stillperiode. Die Studie wurde nach GCP-Kriterien durchgeführt und von der Ethikkommission der Charité zustimmend geprüft.

Die fraktionierte *Paclitaxel-Therapie* wurde als halbstündige Infusion wöchentlich über insgesamt 6 Wochen mit Wiederholung des Zyklus ab Tag 50 (d. h. mit einer Therapiepause von 14 Tagen) verabreicht. Eine halbe Stunde vor Infusion erhielten die Patientinnen eine Prämedikation mit 16 mg Dexamethason, 200 mg Cimetidin und 2 mg Clemastin. Es wurden PVC-freie Infusionssysteme verwendet. Die Therapie wurde bis zur Progression, maximal aber über 4 Zyklen (entsprechend ca. einem halben Jahr) durchgeführt, da bei Initiierung der Studie über die Gefahr einer peripheren Neurotoxizität unter fraktionierter Paclitaxel-Gabe und langer Behandlungsdauer kaum Daten vorlagen. Im Protokoll waren bei eingeschränkter Knochenmarksregeneration unter Therapie primär keine Dosisreduktionen, sondern Therapieverschiebungen von 1 oder 2 Wochen vorgesehen.

Das *restaging* der Patientinnen erfolgte durch eine körperliche Untersuchung sowie bildgebende Verfahren (Röntgen Thorax, Sonographie Abdomen, Skelettszintigramm, Computertomographie und andere entsprechend klinischer Notwendigkeit). Die Lebensqualität wurde mit Hilfe standardisierter und validierter Befindlichkeitsbögen erfaßt. Zentrale Endpunkte waren die objektive Remissionsrate sowie das progressionsfreie Intervall (26). Zur Beschreibung der Tumorlast wurde für die Auswertung zum einen die Anzahl der befallenen Organe gezählt; hierbei galten zum Beispiel eine Lungenmetastasierung und Pleuraergüsse als 2 Organe. Zum anderen wurden drei

Hauptmanifestationsmöglichkeiten definiert als vorherrschend viszeraler, Knochen- oder Weichteilbefall.

Bei allen untersuchten Patientinnenkollektiven mit metastasiertem Mammakarzinom galten folgende Kriterien für die Remissionsbeurteilung: Zweidimensional meßbare Metastasen wurden als Referenzläsionen gewählt. Hierbei wurde als Größenmaß die Summe der Produkte des jeweils längsten und des dazu rechtwinkligen Durchmessers gewählt. Evaluierbare, aber nicht meßbare Metastasen (z. B. Ergüsse oder eine Lymphangiosis carcinomatosa der Lunge) wurden ebenfalls berücksichtigt. Eine komplette Remission (CR) wurde bei Verschwinden aller Tumormanifestationen und Bestätigung des Befundes nach mindestens 4 Wochen diagnostiziert. Zum Erreichen einer partiellen Remission (PR) mußte die Tumorlast im Vergleich zu Therapiebeginn um mehr als 50% reduziert werden; auch dieser Befund bedurfte der Bestätigung nach 4 Wochen. Jede neue Tumormanifestation oder eine mehr als 25%-ige Größenzunahme einer Läsion führte zur Einstufung als Progression (PD). Die Erkrankung wurde als stabil (SD) betrachtet, wenn weder die Kriterien einer PR noch einer PD zutrafen. Eine SD einer evaluierbaren Läsion bei gleichzeitiger CR der meßbaren Tumormanifestationen führte zur Gesamtbeurteilung als PR, während eine stabile, nicht-meßbare Läsion die Diagnose einer PR nicht einschränkte. Das progressionsfreie Intervall wurde definiert als Zeitraum von der Einleitung einer Therapie bis zur Diagnose der Erkrankungsprogression. Als Dauer der Remission galt der Zeitraum vom Erreichen der PR bis zum Zeitpunkt der Progression.

Mit den wöchentlich notwendigen Blutbildkontrollen vor Durchführung der Chemotherapie wurde Serum nach Zentrifugation bei 500 g aliquotiert und bei -30 °C asserviert. In den Jahren 1996-1999 wurden alle Seren auf HER-2/neu mit dem Chiron-Assay (Methodik siehe 4.5.1.) getestet. Da dieser Test ab 1999 nicht mehr kommerziell verfügbar war und durch eine modifizierte und später von der FDA zugelassene Version ersetzt wurde, testeten wir alle Seren (unaufgetaute aliquots) erneut mit diesem durch Oncogene Science vertriebenen kit (Methodik siehe 4.5.2.). Da die Asservierung von Serum nach Befürwortung des entsprechenden Protokollamendments durch die Ethikkommission erst einige Wochen nach Studienstart beginnen konnte und wenige Patientinnen wegen Nebenwirkungen den ersten Zyklus mit wöchentlich fraktioniertem

Paclitaxel nicht beenden konnten, qualifizierten insgesamt 35 Patientinnen aus dieser Studie für die s-HER/neu-Analyse.

4.3.2. Patientinnenkollektiv unter diversen Arten und Linien der Chemotherapie

Die Zahl an Patientinnen zur Untersuchung der Bedeutung von s-HER-2/neu aus der Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel war für eine multivariate Analyse nicht ausreichend und enthielt zudem ein selektiertes Patientinnengut. Wir dehnten die Untersuchung daher auf alle sukzessiven Patientinnen aus, die sich in unserer Mamma-Ambulanz neu einer Chemotherapie unterziehen mussten und uns schriftlich ihr Einverständnis für die longitudinalen Blutuntersuchungen gaben. Diese Patientinnen durften die Chemotherapie unter Studienbedingungen und als Standardtherapie außerhalb einer Studie erhalten. Sowohl Frauen vor Erstlinienchemotherapie wie auch Patientinnen nach mehrfacher chemotherapeutischer Vorbehandlung konnten in die Untersuchung eingehen. Patientinnen unter Hormontherapie wurden nicht eingeschlossen. Insgesamt konnten im Laufe von 3 Jahren 111 Patientinnen rekrutiert werden, deren Serumverlauf repräsentativ war.

4.3.3. Kombination von Chemotherapie und Herceptin

Da Herceptin in Deutschland erst im September 2000 zugelassen wurde und zuvor ca. 2 Jahre lang nur über internationale Apotheken erhältlich war, ist die Anzahl an Herceptin-Patientinnen pro Zentrum sehr begrenzt. Dennoch wurde in einer ersten orientierenden Analyse versucht, die Übereinstimmung von s-HER-2/neu im longitudinalen Verlauf mit dem klinischen Ansprechen zu korrelieren. Hierzu wurden alle Patientinnen herangezogen, die an der Medizinischen Klinik II der Charité am Campus Mitte jemals mit Herceptin behandelt wurden. Diese Patientinnengruppe ist relativ heterogen, was die Anzahl der Vortherapien wie auch die zytostatischen Kombinationspartner von Herceptin angeht. Insgesamt konnten 27 auswertbare Patientinnen aus der Charité in die Analyse eingehen.

Um die Patientinnenzahl zu erweitern, wurden uns aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin freundlicherweise mehrere Hundert Verlaufsproben und die klinischen Daten von weiteren 27 Patientinnen unter Herceptin-Therapie zur Verfügung gestellt. Diese Proben waren im Rahmen einer Untersuchung zur Kardiotoxizität von Herceptin abgenommen worden. In Herzbiopsien wurde die Expression der Rezeptoren EGFR, HER-2/neu, HER-3 und HER-4 gemessen, während parallel im Serum einige Zytokine bestimmt wurden mit der Frage, ob eine akute-Phase-Reaktion durch Herceptin ausgelöst werden würde.

Identisch zu dem bereits beschriebenen Vorgehen der Serumasservierung wurde auch bei den Herceptin-Patientinnen mit den wöchentlich notwendigen Blutbildkontrollen vor Durchführung der Antikörper- und ggf. Chemotherapie das Serum nach Zentrifugation bei 500 g aliquotiert und bei -30 °C asserviert. Die Seren wurden dann in batches auf s-HER-2/neu mit dem Oncogene-Assay getestet.

4.4. Patientinnenkollektive zur HER-2/neu-Konkordanzanalyse

Ein wesentliches Ziel der Untersuchungen von s-HER-2/neu bestand darin, die Wertigkeit der Bestimmung des shed antigens im Serum in Relation zu den verschiedenen HER-2/neu-Gewebetesten zu setzen. Hierfür war es zunächst notwendig, den Prozentsatz der Patientinnen mit HER-2/neu-Überexpression im Gewebe zu bestimmen, die auch im Serum zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel aufzeigten. Diese Fragestellung erlaubte es auch, den Anteil der non-shedder zu evaluieren. Zudem würde sich zeigen, wieviele Patientinnen mit fehlender HER-2/neu-Überexpression im Gewebe dennoch im Stadium IV der Erkrankung eine erhöhte Konzentration von s-HER-2/neu aufweisen. Diese Fragestellung entspricht statistisch einer Vierfeldertafel.

4.4.1. Immunhistochemie des Primärtumors und s-HER-2/neu im Stadium IV

Diese gerade beschriebene Evaluierung erfolgte zum 31. Juni 2001 als Stichtag und bezog sich auf alle immunhistochemisch gesicherten HER-2/neu-Gewebeergebnisse der Mamma-Ambulanz der Medizinischen Klinik II der Charité. Es wurden alle Patientinnen berücksichtigt, von denen der HER-2/neu-Status im Gewebe bekannt war und von denen auch eine Serumprobe zum Zeitpunkt der Progression der metastasierten Erkrankung in der Probenbank asserviert worden war. Es ergab sich eine Fallzahl von 101 Patientinnen mit komplettem Datensatz.

4.4.2. Subgruppenanalyse mit IHC des Primärtumors, computerisierter IHC-Befundung, FISH und s-HER-2/neu im Stadium IV

Die oben erwähnten 101 immunhistochemischen Färbungen auf HER-2/neu waren multizentrisch und mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt worden. Um monozentrisch eine standardisierte IHC auf HER-2/neu durchführen zu können, schrieben wir alle Institute und Praxen für Pathologie an, um entweder die Paraffinblöcke oder Schnitte von diesen Paraffinblöcken zu erhalten. Trotz hohen logistischen und zeitlichen Aufwands konnten wir nur von 30 Patientinnen Tumormaterial erhalten. Dieses Material ging aber über die Primärtumoren hinaus und erstreckte sich insgesamt auf 61 Schnitte von Primärtumoren, lokoregionären Lymphknotenmetastasen, Lokalrezidiven und Fernmetastasen. Von all diesen Schnitten wurden eine standardisierte IHC nach DAKO und eine FISH-Analyse durchgeführt. Zudem wurden die standardisiert gefärbten IHC-Schnitte nicht nur konventionell unter dem Lichtmikroskop von einem erfahrenen Pathologen beurteilt, sondern auch einer computergestützten Befundung auf dem ACIS-System von Chromavision® zugeführt.

4.5. Methoden der s-HER-2/neu-Bestimmung

Bis 1999 stand für die Messung von s-HER-2/neu ein ELISA-Assay der amerikanischen Firma Chiron Diagnostics[®] zur Verfügung. Dieser wurde in der Folge durch eine Weiterentwicklung der Firma Oncogene Science[®] ersetzt. Oncogene Science wurde später durch Bayer Diagnostics[®] aufgekauft, welche die Serummessung von HER-2/neu auch für den klinisch-chemischen Analysenapparat Immuno 1 adaptierten. Während also der Chiron-Assay nur für die Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel zur Verfügung stand, wurden alle weiteren Analysen mit dem ELISA-kit von Oncogene durchgeführt. Lediglich die Seren der Table-Studie wurden automatisiert auf dem Immuno 1 gemessen, da sie als letztes und zeitlich kongruent mit der Zulassung des Immuno 1-Assays zur Verfügung standen und das hohe Probenaufkommen für die automatisierte Testversion besonders geeignet erschien.

Die im folgenden beschriebenen Serummessungen für alle biochemischen Marker erfolgten unabhängig von der Methodik in Doppelbestimmung, um Fehler eingrenzen zu können.

4.5.1. Chiron[®]-Assay

Bei Beginn der Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel stand als standardisierte Methode zur Serum-HER-2/neu-Bestimmung der Chiron[®]-Assay zur Verfügung. Bei diesem Test wird eine Serumprobe (50µl) in einem Streptavidin-beschichteten Röhrchen mit 200 µl SSC-Puffer verdünnt, gemischt und im Anschluß mit 200 µl eines gemischten Antikörperkonjugates versetzt. Dieses besteht aus anti-HER-2/neu-Antikörpern, die mit Meerrettichperoxidase und Isothiocyanat (FITC) markiert sind. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden werden 200 µl eines biotinylierten Antikörpers (Tab 257) zugegeben, der im nächsten, 2-stündigen Inkubationsschritt mit FITC reagiert. Nach dem Dekantieren der Röhrchen und 3 Waschschritten wird der Farbumschlag durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid zunächst in Gang gesetzt

und nach weiteren 25 min durch die Zugabe von 1 ml einer 1-molaren Phosphorsäure beendet. Die Farbintensität wird bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt. Das Meßergebnis läßt sich auf einer Standardkurve ablesen, die mit Hilfe von 4 Standards aufgestellt und mit einer parallel mitgeführten Kontrolle überprüft wurde. Das Meßergebnis wird in U/ml angegeben.

4.5.2. Oncogene Science®-Assay

Nachdem der Chiron®-Assay kommerziell nicht mehr erhältlich war, wurden die weiteren Untersuchungen mit dem Oncogene Science®-Assay durchgeführt. Auch hierbei handelt es sich um einen Enzymimmuno-Assay, bei dem ein monoklonaler anti-HER-2/neu-Antikörper als Beschichtung („capture reagent“) auf einer Mikrotiterplatte spezifisch an die extrazelluläre Domäne von HER-2/neu bindet. Bei dem Test werden 20 µl Serum mit 980 µl gepuffertem „sample diluent“ gemischt und in der Folge 100 µl dieser Verdünnung in die Mikrotiterplatten-wells pipettiert. Nach einer Inkubationsphase von 3 Stunden bei 37 °C und 3 Waschschritten werden 100 µl des monoklonalen, murinen Detektionsantikörpers in jedes well zugefügt. Nach diesem Schritt folgen eine weitere, einstündige Inkubationsphase bei 37 °C und 3 Waschschrritte, bei denen ungebundene Moleküle entfernt werden. Während der Inkubation reagieren die Detektorreagentien mit der immobilisierten, extrazellulären Domäne von HER-2/neu. Die Menge des biotinylierten, nunmehr an das Antigen gebundenen Detektorantikörpers wird durch die Koppelung an ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (100 µl) bestimmt. Das Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat bindet an Biotin an und katalysiert den roten Farbumschlag des chromogenen Substrates O-Phenylendiamin (100 µl), welches nach einer halbstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und 3 abschließenden Waschschrritten hinzugefügt wird. Die Platte wird dann nochmals für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, ehe die Reaktion mit 100 µl Stopplösung (2,5 N H₂SO₄) beendet wird. Die Farbreaktion wird photometrisch bei 490 nm quantifiziert. Insgesamt werden bei dem Test 6 Standards und 1 Kontrolle zur Aufstellung und Verifizierung der Eichkurve

mitgeführt. Das Meßergebnis trägt die Einheit ng/ml bei einem analytischen Range der unverdünnten Probe von 3,6-36 ng/ml.

4.5.3. Immuno 1[®]-Plattform

Bei dem HER-2/neu-Serum-Assay auf der Immuno 1[®]-Plattform handelt es sich um einen magnetischen Separationsimmunoassay. Bei dem Test werden die gleichen monoklonalen Antikörper (NB-3 und TA-1) eingesetzt wie beim oben beschriebenen Oncogene-Assay. Sie docken an jeweils unterschiedliche Bindungsstellen der extrazellulären Domäne von HER-2/neu an. Das Reagenz 1 besteht aus dem Antikörper NB-3, der mit Fluorescein markiert ist. Reagenz 2 entspricht dem Fab-Fragment von TA-1, das seinerseits an die alkalische Phosphatase als ausführendem Enzym gekoppelt ist. Reagenz 1 (65 µl), Reagenz 2 (65 µl) und die gewünschte Serumprobe bzw. Standard oder Kontrolle (20 µl) werden bei 37 °C für 20 min auf der Plattform inkubiert. Im nächsten Schritt werden Magnetpartikel, die kovalent an einen anti-Fluorescein-Antikörper (20 µl) gebunden sind, zugefügt, um Sandwich-Immunkomplexe auszubilden. Nach 28 min werden die Magnetpartikel-Antikörper-Komplexe durch Waschvorgänge von den ungebundenen Molekülen getrennt und das chromogene Substrat (p-Nitrophenylphosphat) der alkalischen Phosphatase zugefügt, welche die Reaktion von p-Nitrophenylphosphat und Wasser in p-Nitrophenoxid und Phosphat katalysiert. Die Absorption wird bei 405 nm und 450 nm gemessen und die Probenkonzentration von Serum-HER-2/neu anhand der mit 6 Standards aufgestellten Eichkurve bestimmt. Für unverdünnte Proben reicht der analytische Range von 0,1-250 ng/ml.

Zum Ausschluß eines Einflusses einer Medikation mit Herceptin auf die s-HER-2/neu-Bestimmung wurde mit einer Herceptin-Stammlösung in Patienten- und Kontrollseren eine Verdünnungsreihe aufgestellt, die Endkonzentrationen von Herceptin im Meßsubstrat von 0-410 µg/l ergab. Auch diese Seren wurden im Anschluß auf dem Immuno 1 analysiert. Diese Untersuchung führten wir nicht im eigenen Labor durch (Bayer Diagnostics Business Group, data on file und publiziert in verschiedenen Produktinformationen, z. B.

(27)). Sie sollen hier nur erwähnt und im Ergebnisteil zitiert werden, da sie für die Reliabilität und Interpretation der Messungen an Herceptin-Patientinnen relevant sind.

4.6. Methodik der s-EGFR-Bestimmung

Auch bei dem s-EGFR-Test handelt es sich um einen Doppelsandwich-Immunoassay, der einen capture-Antikörper von der Maus und einen ebenfalls murinen, mit alkalischer Phosphatase-markierten Detektionsantikörper einsetzt. Beide Reagentien binden spezifisch an die extrazelluläre Domäne von EGFR. Es ist wichtig, daß der Detektionsantikörper keine Kreuzreaktion mit der extrazellulären Domäne von HER-2/neu eingeht. Die Mikrotiterplatten-wells sind mit dem capture-Antikörper beschichtet. Für den Test werden in jedes well 100 µl der Probe pipettiert und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Danach werden alle wells 6 mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen. Dabei wird nach 3 Waschschritten die Mikrotiterplatte um 180 Grad gedreht. Das immobilisierte Antigen wird dann dem mit alkalischer Phosphatase markierten Detektionsantikörper (100 µl) ausgesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Im nächsten Schritt werden 100 µl des Substrates der alkalischen Phosphatase (p-Nitrophenylphosphat) zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl der Stopplösung wird die Reaktion beendet. Die photometrische Messung der Färbung sollte innerhalb von 15 min bei einer Wellenlänge von 405 nm stattfinden. Die EGFR-Konzentration im Serum wird mit Hilfe einer an 6 Standards aufgestellten Eichkurve ermittelt. Der analytische Range unterdünnter Proben reicht bis 300 ng/ml.

4.7. Methodik der s-uPA-Bestimmung

Bei dem Oncogene Science® s-uPA-ELISA-Test handelt es sich ebenfalls um einen Sandwich-Immunoassay, der 2 monoklonale Antikörper gegen menschliches uPA als capture-Reagentien einsetzt, mit welchen die innere Oberfläche der Mikrotiterplatten-wells

beschichtet ist. Bei dem Test werden 100 µl vorverdünnten Serums in Doppelbestimmung in die beschichteten wells pipettiert und über Nacht (12 bis 18 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden alle wells 6 mal mit je 300 µl Waschlösung per well gewaschen. Ähnlich wie beim EGFR-Assay wird nach 3 Waschschritten die Mikrotiterplatte um 180 Grad gedreht. Im nächsten Schritt werden 100 µl des Detektorantikörpers (vom Kaninchen) hinzupipettiert und bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Die Menge des an das Antigen gebundenen Detektorantikörpers wird dadurch bestimmt, daß 100 µl eines mit Meerrettichperoxidase markierten anti-Kaninchen-Antikörpers (von der Ziege) vom IgG-Typ zugegeben werden und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert bleiben. Als Substrat der Meerrettichperoxidase dient O-Phenylendiamin (100 µl) als chromogenes Substrat. Dieses inkubiert bei Raumtemperatur für 45 min unter Lichtschutz. Durch die Zugabe von 100 µl der Stoplösung wird die Reaktion beendet und die Absorption photometrisch innerhalb von 30 min mit einem 490 nm-Filter gemessen. Anhand einer Standardkurve aus 6 Standards wird eine Eichkurve aufgestellt und die uPA-Konzentration in der Einheit pg/ml abgelesen. Der analytische Range unverdünnter Proben reicht bis 3500 pg/ml.

4.8. Methodik der CA 27.29-Bestimmung

CA 27.29 wurde auf dem klinisch-chemischen Analysenapparat ACS:180[®] gemessen. Bei dem Test handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay auf Chemilumineszenzbasis. Hierbei werden 25 µl unverdünntes Serum simultan mit den beiden folgenden Reagentien inkubiert: Das lite-Reagenz (50 µl) enthält einen spezifischen, monoklonalen Anti-CA 15-3-Antikörper (B27.29), der als tracer mit einem Acridiniumester markiert ist. B 27.29 bindet an die Tandemregion von MUC-1. Das „solide phase“-Reagenz (250 µl) enthält angereichertes CA 15-3, das kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist. Nach der Inkubationszeit von 7,5 min bei 37 °C werden die Partikel magnetisch separiert und gewaschen. Eine Chemilumineszenzreaktion wird gestartet und die Menge an emittiertem Licht wird in sogenannten „relative light units“ (RLU) gemessen. Die CA 27.29-Spiegel werden mit Hilfe einer Eichkurve

(insgesamt 7 Standards) berechnet und in U/ml angegeben. Für unverdünnte Proben reicht der analytische Range bis 450 U/ml.

4.9. Methodik der HER-2/neu-Immunhistochemie

Die standardisierte, immunhistochemische Bestimmung der HER-2/neu-Expression wurde gemäß der Produktbeschreibung des Herstellers (DAKO HercepTest®) durchgeführt. Von dem archivierten Paraffinmaterial werden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf sialinisierte Objektträger aufgezogen. In der Folge werden die Schnitte auf 60 °C erwärmt, bis das Paraffin schmilzt. Die Gewebeschnitte werden in Xylol (2 x 5 min) entparaffinisiert und in einer Reihe von Alkohol (2 x 3 min 95% Ethanol, gefolgt von 2 x 3 min 70% Ethanol) und destilliertem Wasser (30 sec) rehydriert.

Danach wird die 1:10 verdünnte „epitope retrieval“-Lösung in einer Küvette in ein Wasserbad gestellt und auf 95-99 °C temperiert. Die entparaffinisierten Gewebeschnitte werden hierin über die Dauer von 40 min inkubiert, nach dieser Zeit für 20 min bei Raumtemperatur zum Abkühlen stengelassen und schließlich in einem Waschpufferbad gewaschen. Danach werden die Schnitte mit 100 µl Peroxidase-Blockungsreagenz überdeckt, für 5 min inkubiert und erneut mehrfach in destilliertem Wasser und Waschpuffer gewaschen. Als nächster Schritt werden die Schnitte mit dem primären, monoklonalem Anti-Human-HER-2/neu-Antikörper (vom Kaninchen) für 30 min inkubiert. Die Immunreaktion wird nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit dem DAKO Visualisationsreagenz, einem Konjugat aus Dextranpolymer, Meerrettichperoxidase und anti-Kaninchen-Immunglobulin (von der Ziege), sichtbar gemacht. Als Chromogen werden 30 µl 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) eingesetzt, für 10 min inkubiert, die Schnitte dann mit Hämatoxyllin gegengefärbt und abschließend mehrfach in destilliertem Wasser gewaschen. Bei den negativen Kontrollen wird der primäre Antikörper durch normales Kaninchenserum ersetzt.

Die Beurteilung der HER-2/neu-Färbung erfolgt durch einen erfahrenen Pathologen gemäß eines standardisierten Scoring-Systems: Die Färbung wird als 0 eingestuft, wenn keine oder weniger als 10% der Zellen eine Membranfärbung aufweisen. Wenn eine kaum erkennliche oder geringe Membranfärbung bei mehr als 10% der Zellen sichtbar ist, wird der Tumor als +1 eingestuft. Die Score +2 oder +3 werden vergeben, wenn die Membranfärbung bei mehr als 10% der Zellen mäßig oder stark ausgeprägt ist. Als Überexpression werden gemäß den Zulassungsbedingungen von Herceptin in den USA die Scores +2 und +3 gewertet.

4.10. Methodik der computerisierten HER-2/neu-IHC-Befundung

Das computerisierte „Automated Cellular Imaging[®]“-System (ACIS-System) wurde zur sekundären Befundung der nach DAKO auf HER-2/neu gefärbten Gewebeschnitte eingesetzt mit dem Ziel, den Einfluß des individuellen Untersuchers zu eliminieren. Bei dem ACIS-System handelt es sich um ein interaktives Verfahren, bei dem eine automatisierte Mikroskopie mit einer computergestützten Bildverarbeitung kombiniert wird (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: Hardware des ACIS-Systems mit automatisierter Lichtmikroskopie und nachgeschalteter Bildverarbeitung am Computer (mit freundlicher Genehmigung von ChromaVision[®] Medical Systems, San Juan Capistrano, USA).



Der automatisierten Gewebefebefundung liegt ein Scoring-Algorithmus zugrunde, der eine präzise Quantifizierung der Färbungsintensität im Sinne eines voll quantitativen Tests erlaubt. Das ACIS-System integriert die Prinzipien der sogenannten „Color Space Transformation“, des „Morphological Sorting“ und des „Rapid Counting“, welche in der Summe eine rasche Erkennung und Bearbeitung der Zielregionen auf der Basis von Farbe, Größe und Gestalt erlauben (28;29).

Durch die hochflexible „Color Space Transformation“ kann in jedem einzelnen histologischen Gewebeschnitt die exakte Farbzusammenstellung identifiziert werden. Die digitalen Bilder, die durch das ACIS-System erfaßt werden, bestehen aus distinkten Pixels, die sich wiederum aus den drei Farben Rot, Grün und Blau zusammensetzen. Innerhalb dieser drei Farbbänder wird die Pixelintensität von 0–255 auf einer metrischen Skala definiert. Der mathematische Aufbau dieses Algorithmus erlaubt es dem System, alle wichtigen Pixel einer spezifischen Farbe jenseits des Schwellenwertes, einer spezifischen Gestalt oder einer definierten Intensität in dem Programm zu identifizieren. Sobald all diese Pixel gefunden wurden, wird das Farbbild in ein Schwarzweißbild mit starkem Kontrast konvertiert, indem die Pixel jenseits des Schwellenwertes in Weiß vor einem schwarzen Hintergrund abgebildet werden. So wird selbst die Abgrenzung eines einzigen Pixels möglich, was die Qualität des Ergebnisses und auch die Untersuchungszeit optimiert und gleichzeitig relativ wenig Speicherplatz notwendig macht. Das „Morphological Sorting“ unterscheidet mehr als 50 Gestaltparameter, um die Zielstrukturen morphologisch genau einzuordnen. Der „Rapid Counting“-Prozeß ist für die absolute und relative Quantifizierung von möglichen Zielstrukturen und anderen Gewebebestandteilen wie Stromazellen und Gefäßen verantwortlich. Durch diese 3 genannten Techniken ist eine exakte histologische Rekonstruktion des Präparateschnitte auf dem Computerbildschirm möglich.

Die HER-2/neu-Befundung auf dem digitalen ACIS-Mikroskop findet wie folgt statt: Aus dem Slidekarussell wird automatisch der nächste Schnitt auf den Objektträgerisch des Mikroskopes transportiert. Gemäß den oben geschilderten Techniken wird ein Übersichtsbild des gesamten Schnittes gescannt. Der Pathologe wählt aus dieser Übersicht mindestens 6 interessierende, korrekt gefärbte Bereiche für die Beurteilung aus. Für jede

dieser regions of interest bestimmt das System einen eigenen Score und mittelt das Endergebnis über die Einzelergebnisse. Der HER-2/neu-Score entspricht damit der mittleren Braunfärbung der Pixel jenseits einer vordefinierten Farbschwelle für die DAB-Färbung des DAKO HercepTests. Diese Pixel werden mit Hilfe eines Algorithmus innerhalb der region of interest nur dann identifiziert, wenn sie sicher der Plasmamembran zuzuordnen sind. Die ACIS-Skala für die immunhistochemischen HER-2/neu-Färbung reicht von 0-255 und wird auf den üblichen DAKO HercepTest-Score umgerechnet. Da sich das ACIS-Scoring über einen großen Pixelrange erstreckt, kann das System aber innerhalb des DAKO HercepTest-Scores von +3 noch weiter auflösen und das Scoring-Resultat auf +4 und +5 erweitern. Durch die höhere Genauigkeit der digitalen Mikroskopie können die Ergebnisse auch in Zehntelbruchteilen als lineares, metrisches Ergebnis ausgegeben werden (zum Beispiel 1,3 oder 2,1). Als HER-2/neu- positiv werden Präparate mit einem Durchschnittsergebnis $>2,0$ angegeben.

4.11. Methodik der HER-2/neu-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Anzahl der Genamplifikate von HER-2/neu für die Konkordanzanalyse verschiedener Nachweismethoden von HER-2/neu wurde an Paraffinschnitten von Primärtumoren und Metastasen mittels des Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungsassays der Firma Ventana[®] bestimmt. Hierfür müssen die Schnitte wie folgt präpariert werden: Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Mammakarzinomschnitte mit einer Dicke von 4 μm werden auf sialinierte Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 60 °C erhitzt, in Xylen über 2 x 5 min entparaffinisiert und schließlich 2 x 5 min in 100%-igem Ethanol gebadet. Nach dem Trocknen werden die Schnitte über 15 min bei 42 °C mit der Vorlösung behandelt und mit saline sodium citrate (SSC)-Puffer (pH = 7,0) für 2 min gewaschen.

Für den Proteinverdau werden die Gewebeschnitte über 1 Stunde bei 42 °C mit einer Proteaselösung [0,25 mg/ml, 40 ml 2x SSC + 400 μl protein digestion enzyme PDE in einer Konzentration von 25 mg/ml] inkubiert. Nach dem Proteinverdau werden die Schnitte über 10 sec bei Raumtemperatur in 2x SSC gewaschen. Danach werden 10 μl

Propidiumiodid/Antifade-Gegenfarbe auf den Schnitt aufgebracht. Der Objektträger wird mit einem Deckgläschen abgedeckt und auf einen korrekten Verdau untersucht. Sofern dieser noch nicht als ausreichend eingestuft werden kann, werden beide Schritte (Vorbehandlung mit Vorlösung und Verdau) wiederholt. Vor der Hybridisierung werden die Schnitte erneut zweimal für 10 sec bei Raumtemperatur in 2x SSC-Lösung gewaschen. Als nächstes folgt die Dehydratation über jeweils 1 min in zunächst 70%-igem Ethanol, dann 80%-igem Ethanol und schließlich 95%-igem Ethanol. Die Schnitte werden luftgetrocknet.

Die Digoxigenin (DIG)-markierte HER-2/neu-Sonde wird vor dem Auftragen über 5 min bei 37 °C erwärmt und dann in einer Menge von 10 µl auf jeden aufgezogenen Gewebeschnitt aufgetragen. In der Folge werden die Schnitte über 10 min bei 72 °C denaturiert. Die Schnitte werden mit einem Deckglas abgedeckt und über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer hybridisiert. Danach werden die Schnitte zunächst zweimal bei 72 °C in 2x SSC und dann einmal in 1x PBD (phosphatgepuffertes Detergens) bei Raumtemperatur über jeweils 2 min gewaschen.

Die Detektion erfolgt mit 60 µl Fluoreszein-markiertem Anti-DIG. Das Detektionsreagenz wird auf die Schnitte aufgebracht und das Material in der Folge in einer vorgewärmten feuchten Kammer bei 37 °C über 10 min inkubiert. Dann werden die Schnitte 3 x für jeweils 2 min in 1x PBD gewaschen. Die Zellkerne werden mit 10 µl Propidiumiodid/Antifade gegengefärbt.

Die Hybridisierungssignale werden an 100 Interphasekernen pro Schnitt ausgezählt. Überlappende Zellkerne und Kerne ohne Hybridisierungssignale werden nicht berücksichtigt. Die Mikroskopie und Photographie erfolgt in unserem Fall mit einem Zeiss® Fluoreszenzmikroskop, das mit einer 100 W Quecksilberdampfampe und Objektiven hoher numerischer Apertur ausgestattet ist. Die Schnitte werden bei 40-facher Vergrößerung nach Propidiumjodid-Exzitation gescannt, um die Areale zu lokalisieren, die bereits im Vorfeld am Hämatoxylin-Eosin-Schnitt histopathologisch charakterisiert wurden (siehe Tabelle 1). Die Befunde werden durch konventionelle Photomikrographie dokumentiert. Die Lichtanregung von Fluorescein und Propidiumjodid erfolgt unter

Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampfampe bei passenden Filtern für die Emission von gelbgrünem und rotem Licht.

Tabelle 1: Filter und Wellenlängen für die HER-2/neu-Fluoreszenzmikroskopie

Chromogen	Farbe	Filter
FITC	gelb-grün	490/525
PJ	rot	520/610

Das Auszählen der Signale erfolgt bei 100-facher Vergrößerung an 100 unselektierten Tumorzellkernen. Tumoren, die bis zu 4 HER-2/neu-Signale pro Zellkern aufweisen, werden als normal, d. h. HER-2/neu negativ, befundet. Überamplifizierende Tumoren werden in die Gruppen mit moderater Überamplifikation (5-10 Genkopien pro Nucleus) und starker Überamplifikation (>10 Genkopien pro Nucleus) eingeteilt.

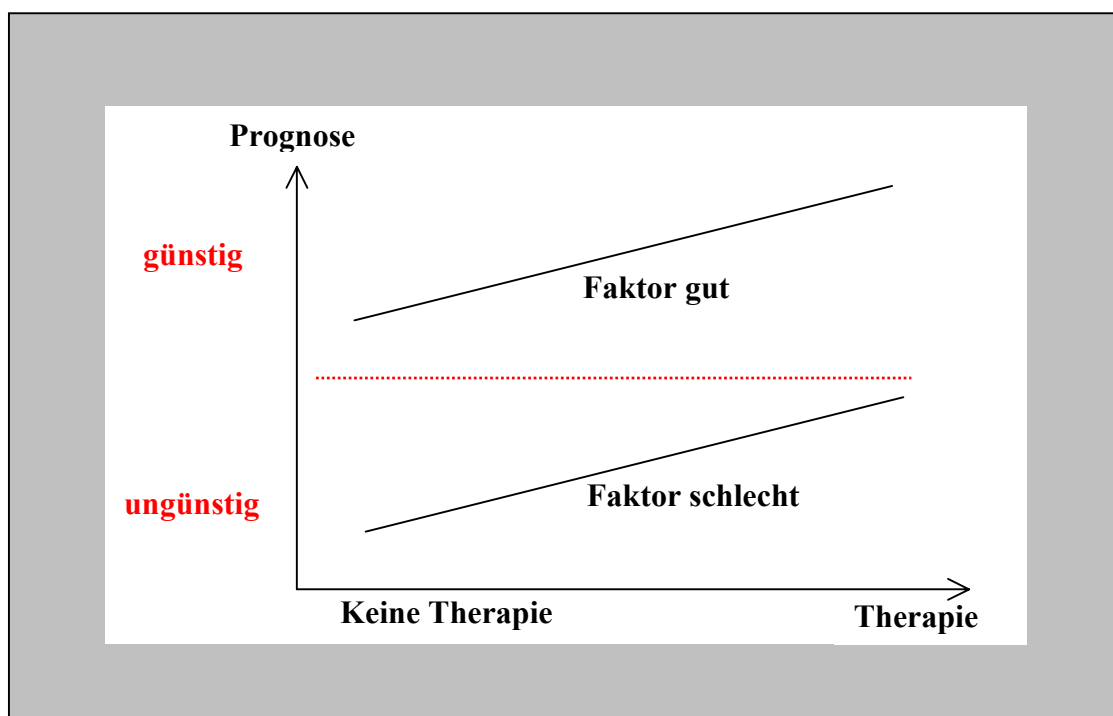
4.12. Begriffliche Definitionen

Diese Schrift beschäftigt sich bevorzugt mit der prädiktiven Bedeutung von HER-2/neu im Serum. Die Begriffe „Prädiktion“ und „Prognose“ stehen in der aktuellen Forschung und Literatur zum Mammakarzinom sehr im Vordergrund, werden aber häufig mißverständlich eingesetzt. Dies liegt in der Natur der Sache, da kaum ein prognostischer oder prädiktiver Faktor ausschließlich als prognostisch oder prädiktiv eingestuft werden kann. Die meisten demographisch oder tumorbiologisch wichtigen Faktoren des Mammakarzinoms haben sowohl prognostische wie auch prädiktive Qualität. Im folgenden sollen als Voraussetzung für die weitere Arbeit die Begriffe Prognose und Prädiktion durch Definitionen so weit wie möglich und sinnvoll abgegrenzt werden.

4.12.1. Prognose

Prognostische Faktoren sind direkt mit der Aggressivität und dem Metastasierungspotential des Primärtumors assoziiert. Ein rein prognostischer Faktor trennt ein erkranktes Kollektiv *unabhängig von der Behandlung* in die Gruppen mit günstigem und ungünstigem Verlauf auf. Dies bedeutet, daß eine Patientin ihre durch den Faktor definierte Subgruppe auch durch die Kombination von mehreren, ggf. auch höchst intensiven Maßnahmen, nicht verlassen kann (siehe Abbildung 6). Als typisches Meßkriterium für das Mammakarzinom gilt das Gesamtüberleben, ein typischer prognostischer Faktor für das Mammakarzinom ist der Nodalstatus. Diese Definition eines prognostischen Faktors impliziert auch, daß die Identifikation im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollkollektiv stattfinden sollte. Nach der Sicherung der Wirkung der adjuvanten Therapie ist es (bis auf die seltene Situation des sehr kleinen, nodal-negativen Primärtumors) allerdings nicht mehr vertretbar, größere unbehandelte Kontrollkollektive zu bilden. Gleichzeitig können historische Referenzkollektive wegen der unterschiedlichen Identifikation von Primärtumoren durch die Frühdiagnostik ebenfalls nicht mehr herangezogen werden. Insofern ist die Abgrenzung eines prognostischen Faktors aktuell nur sehr bedingt möglich.

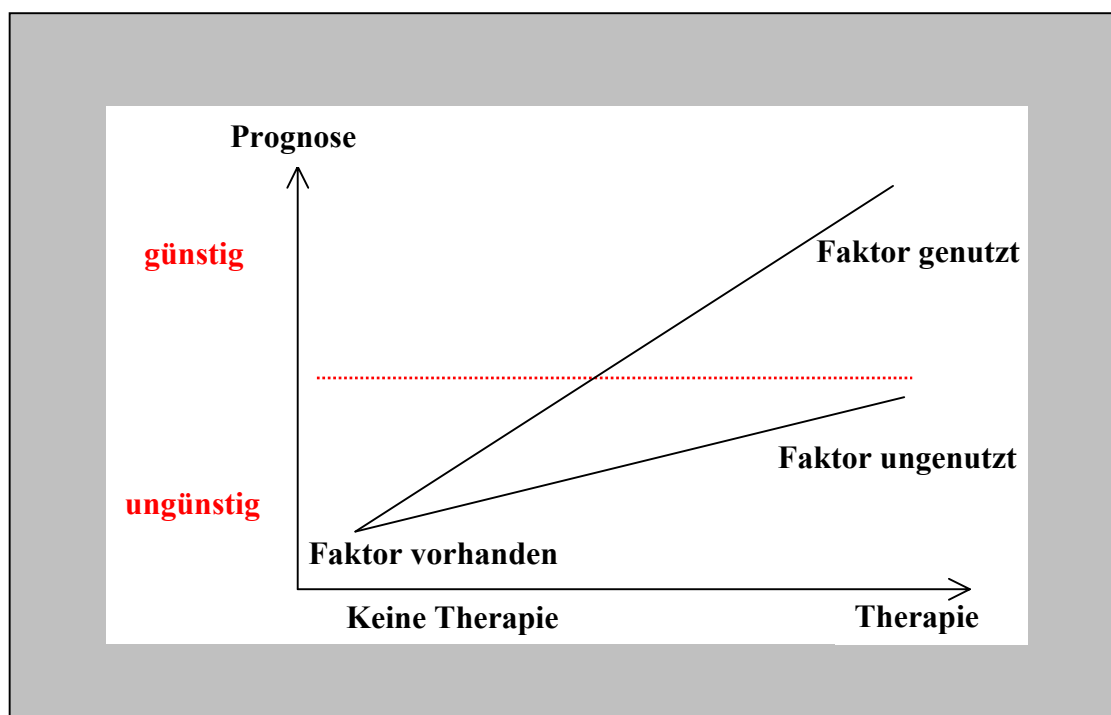
Abbildung 6: Konzeptionelle Darstellung eines prognostischen Faktors (nach Hayes et al., 1998) (30)



4.12.2. Prädiktivität

Prädiktive Faktoren werden durch die relative Empfindlichkeit bzw. Resistenz eines Tumors gegenüber Therapiemaßnahmen und Medikamenten bestimmt. Diese Sensitivität bzw. Resistenz beruht auf der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von spezifischen Faktoren, die Voraussetzung für die Wahl entsprechend angepaßter Therapieformen sind. Dies bedingt auch, daß ein eigentlich günstiger, prädiktiver Faktor ohne Einleitung einer spezifisch darauf abgestimmten Therapie klinisch nicht ausreichend apparent wird und der Verlauf von Patientinnen mit und ohne diesen günstigen prädiktiven Faktor sich angleicht. Bei Einleitung dieser spezifisch gerichteten Behandlung trennen sich die beiden Untergruppen auf (siehe Abbildung 7). Der bislang beste prädiktive Faktor in der Therapie des Mammakarzinoms ist der Steroidhormonrezeptorstatus, wenngleich dieser auch prognostische Qualitäten hat (siehe Kapitel 4.12.1.).

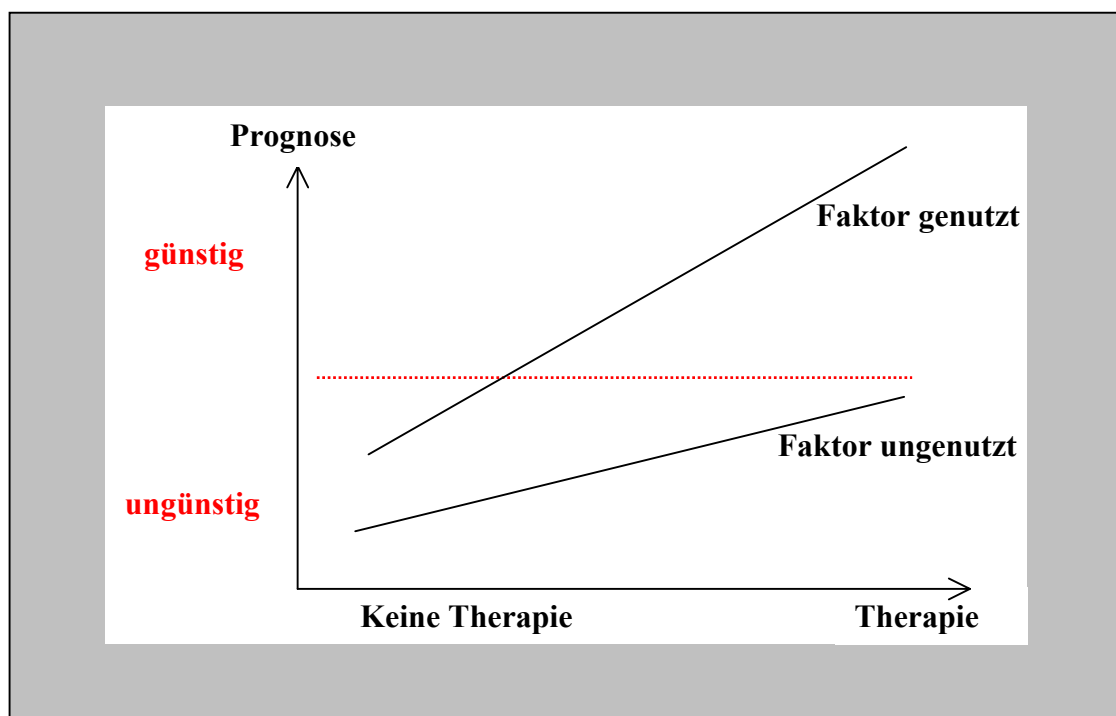
Abbildung 7: Konzeptionelle Darstellung eines prädiktiven Faktors (nach Hayes et al., 1998) (30)



4.12.3. Gemischt prognostische und prädiktive Faktoren

Natürlich kann ein biochemischer Faktor sowohl prognostische wie auch prädiktive Qualität haben. Dies ist sogar für die meisten Parameter die Regel. Ein gemischter, prognostisch-prädiktiver Faktor trennt das Erkrankungskollektiv unabhängig von Therapieinterventionen zu einem gewissen Maße in Untergruppen auf. Bei Einleitung einer gerichteten Therapie wird diese Separation aber nochmals deutlich akzentuiert, wenn dadurch ein spezifischer Faktor verbessert genutzt wird (siehe Abbildung 8).

Abbildung 8: Konzeptionelle Darstellung eines kombiniert prognostischen und prädiktiven Faktors (nach Hayes et al., 1998) (30)



Es muß nochmals betont werden, daß die Entdeckung eines rein prognostischen Faktors an Studien mit unbehandeltem Kontrollkollektiv gebunden ist. Mit Erweiterung der Therapieoptionen für das Mammakarzinom ist dies ethisch nicht mehr erfüllbar. Auch die Bezugnahme auf historische Kollektive ist aus ähnlichen Gründen nicht angemessen. Man muß daher davon ausgehen, daß die meisten Einflußfaktoren für das Mammakarzinom nicht nur biologisch, sondern auch aufgrund der methodischen Nachweismöglichkeiten, zu einem gewissen Grad prognostische *und* prädiktive Qualität haben.

4.12.4. Monitoring

Das Hauptanwendungsgebiet von biochemischen Faktoren im Serum, welche gewöhnlich als „Tumormarker“ bezeichnet und damit inhaltlich nicht differenziert werden, ist die Verlaufsbeurteilung von soliden Tumoren. Hierbei gibt es unterschiedliche Empfehlungen zur Interpretation. In einer kürzlich publizierten Studie der anerkannten Tumormarkerarbeitsgruppe aus Nottingham wurde für einen Score aus drei unterschiedlich spezifischen biochemischen Faktoren (BSG, CEA, CA 15-3) zur Remissionsbeurteilung des metastasierten Mammakarzinoms ein relativer Anstieg bzw. Abfall von 20% von Konsultation zu Konsultation („visit-per-visit“) für die Wertung als Progression bzw. Remission vorgeschlagen (31). Hierbei zeigte sich eine Übereinstimmung des biochemischen Verlaufes und der Beurteilung nach UICC-Kriterien von 87% für progrediente und von 67% für remittierende Patientinnen. Ein identisches Ergebnis war sogar bei dem Unterschied δ von nur 10% von visit-per-visit erzielt worden, die schriftliche Vollversion fokussierte aber auf den erwähnten Unterschied von 20% (Prof. Robertson, Nottingham, persönliche Mitteilung).

Ähnliche Untersuchungen zum direkten Vergleich von CA 15-3 und CEA für das Monitoring des metastasierten Mammakarzinoms setzten einen Wert von 25% Veränderung an, arbeiteten dabei aber nicht auf einer „visit-per-visit“-Basis, sondern bezogen sich stets auf den Eingangswert (32;33). Da dies dem prospektiven Monitoringcharakter in der klinischen Praxis nicht entgegenkommt, haben wir uns für die Beurteilung des Monitoring durch s-HER-2/neu im Rahmen multizentrischer Studien für „visit-per-visit“-Analysen mit 15% Veränderung im Vergleich zum Vorwert entschieden. Dies paßt auch gut zu den Daten, die hinsichtlich der intraindividuellen Variabilität von s-HER-2/neu erhoben wurden (11). Bei einem prozentualen Variationskoeffizienten (%VC) von 6,03% fielen 95% der Wiederholungsuntersuchungen in den Bereich des Zweifachen der Standardabweichung, entsprechend einer Variation von $\pm 12\%$ des Mittelwertes. Damit muß jede Abweichung von mehr als 12% im Vergleich zur Voruntersuchung als Indikator für eine Veränderung der Tumorlast angesehen werden.

Ob tatsächlich eine prozentuale Änderung im Vergleich zur Voruntersuchung als Bewertungsgrundlage ausreicht, oder nur eine Normalisierung eines initial erhöhten Tumormarkerspiegels im Therapieverlauf als verlässlicher Indikator für ein Ansprechen auf die Therapie angesehen werden kann, kann im Augenblick noch nicht entschieden werden (34). Hierzu gibt es bei den nationalen wie internationalen Fachgesellschaften für keine Tumorentität eine eindeutige Festlegung.

4.12.5. Screening

Der Aspekt des Screenings wird aus dieser Arbeit völlig ausgegliedert, obwohl Screening häufig mit biochemischen Faktoren generell und insbesondere mit den konventionellen Tumormarkern in Verbindung gebracht wird. Aufgrund seiner biologischen Eigenschaften (nur ca. 25-30% aller Mammakarzinompatientinnen zeigen eine HER-2/neu-Überexpression im Primärtumor) wäre s-HER-2/neu a priori zum Screening ungeeignet. Zudem zeigen in der Primärsituation nicht etwa, wie vielleicht erwartet, rund 30% aller Mammakarzinome einen erhöhten Serumspiegel für HER-2/neu, sondern nur 5-10%, was sich durch die Abhängigkeit der s-HER-2/neu-Konzentration von der Tumorlast erklären läßt, die beim Primärtumor noch sehr gering ist (35).

4.13. Statistik

Die statistischen Berechnungen dieser Habilitationsschrift wurden fast ausnahmslos von den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biometrie der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. K.-D. Wernecke durchgeführt. Für die einzelnen Fragestellungen wählte Prof. Wernecke nach Darstellung des medizinischen Hintergrundes die passenden statistischen Methoden aus. Insbesondere für das longitudinale Monitoring mit Meßwiederholungen wurden hierfür moderne Berechnungsansätze angewendet. Die

Statistik wurde im allgemeinen mit SPSS für Windows 2000 in der Version 10 und mit SAS in der Version 8.1 erarbeitet.

4.13.1. Bestimmung der cut-off-Werte von s-HER-2/neu, s-EGFR, s-uPA und CA 27.29

Zur Ermittlung der cut-off-Bereiche für die genannten Serumfaktoren nutzten wir ROC (Receiver Operating Characteristics)-Kurven. Hierbei werden in einem Koordinatenkreuz auf der X-Achse 1 minus Spezifität, auf der Y-Achse die Sensitivität in einer Skalierung von 0 bis 1 aufgetragen. Je besser die Trennschärfe, desto rechteckiger wird die ROC-Kurve. Die Entscheidung für einen cut-off-Wert bzw. cut-off-Bereich erfolgte vornehmlich klinisch unter Berücksichtigung der Prävalenz der Erkrankung und mit dem Ziel einer hohen positiven Prädiktivität. Maßgeblich waren weiterhin die Serumkonzentrationen, welche die Eckpunkte einer 95%-igen Sensitivität und Spezifität markierten. Als weitere Orientierungshilfen wurden die Accuracy (Quotient aus allen richtigen Ergebnissen/alle Ergebnisse) und der Youden-Index (Summe aus Sensitivität plus Spezifität minus 1) herangezogen.

4.13.2. Multizentrische Untersuchung zu s-HER-2/neu

Für die multizentrische Untersuchung zur Ermittlung des oberen cut-off-Wertes von s-HER-2/neu auf dem Immuno 1-System wurde ähnlich vorgegangen. Auch hier wurde eine Sensitivität von 95% als Entscheidungskriterium herangezogen. Ausgehend von diesem oberen cut-off konnte dann die Spezifität des s-HER-2/neu-Spiegels von Mammakarzinompatientinnen gegenüber Frauen mit benignen Brusterkrankungen sowie gegenüber Patientinnen mit anderen chronischen Erkrankungen ermittelt werden. Die Größe der Untersuchungskollektive lag bei 280 gesunden Kontrollen, 100 Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen und 110 Patientinnen mit chronischen Nicht-Brusterkrankungen. Nach

Festlegung des cut-off-Wertes wurde die Sensitivität der s-HER-2/neu-Konzentration für die unterschiedlichen Stadien des Mammakarzinoms bestimmt.

4.13.3. Analysen im Rahmen der Table-Studie

Deskriptive Standardmethoden wurden zur Bestimmung der Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Range und Perzentilen der Serumkonzentrationen aller biochemischen Faktoren (s-HER-2/neu, CA 27.29, LH, FSH, Östradiol, Leuprorelin) angewandt. Nichtparametrische Korrelationsanalysen (Spearman'sches rho) und Testprozeduren (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis) wurden herangezogen, um Unterschiede zwischen den s-HER-2/neu-Spiegeln und den demographischen Angaben aufzudecken.

In einer ersten orientierenden Untersuchung wurde für die Fragestellung, ob sich der s-HER-2/neu-Wert im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur baseline in den beiden Behandlungsarmen verändert, der Sign-Test verwendet. Der Sign-Test fokussiert mehr auf den Median als den Mittelwert als Maß für die allgemeine Tendenz. Er geht als einzige Voraussetzung von einer kontinuierlichen Verteilung der Testvariable aus. Für den direkten Vergleich der baseline-Werte und jeder Folgemessung wurde dann zweiseitig mit dem t-Test für gepaarte Stichproben geprüft. Diese Form der Berechnung erlaubte a priori sowohl einen Abfall wie auch einen Anstieg der s-HER-2/neu-Werte und ging nicht schon von Beginn an von einem Anstieg aus.

Die nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Meßwiederholungen nach Brunner wurde verwendet, um Unterschiede der s-HER-2/neu-Verläufe zwischen den beiden Behandlungsarmen festzustellen und um Zeiteffekte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Monaten (30 Monate für Patientinnen unter Leuprorelintherapie) sowie Wechselwirkungen zu erkennen (36). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die relativen Randeffekte (nach Brunner) herangezogen. Diese beschreiben zum Beispiel die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Meßwerte einer bestimmten Behandlungsgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt von allen

Messwerten des Versuchs unterscheiden. Anhand dieser Darstellungsform zeigt sich, wie sich die Verläufe mit der Zeit verändern oder zwischen den Gruppen unterscheiden. Ein relativer Randeffect $>0,5$ bedeutet, daß die Meßkonzentrationen (zu diesem Zeitpunkt in dieser Behandlungsgruppe) gegenüber allen gepoolten Ergebnissen zu höheren Werten tendieren, die Tendenz ist umso größer, je größer der relative Randeffect ist. Analog zeigt ein relativer Randeffect $< 0,5$ eine Tendenz zu kleineren Meßwerten auf. Dies bedeutet auch, daß nur unbedeutende Veränderungen vorliegen, wenn die relativen Randeffecte um den Wert 0,5 undulieren. Signifikante Veränderungen der Serumkonzentrationen gegenüber dem Therapiebeginn wurden mit dem Wilcoxon-Test für paarweise Vergleiche ermittelt.

4.13.4. Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel

Für den Vergleich der Remissionsraten zwischen den s-HER-2/neu-positiven und den s-HER-2/neu-negativen Patientinnen wurde der Mantel-Haenszel-Test verwendet. Der Vergleich des progressionsfreien Überlebens und der Ansprechdauer erfolgte mit dem Log-Rank-Test. Als Irrtumswahrscheinlichkeit erster Ordnung wurde für alle Berechnungen ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ gewählt. Eine Cox-Regressionsanalyse unter Berücksichtigung aller Variablen des Primärtumors konnte bei insgesamt 35/50 auswertbaren Patientinnen nicht durchgeführt werden.

4.13.5. Erweiterte Untersuchung zur Prädiktivität unter Mehrlinienchemotherapie

Durch die erhöhte Fallzahl ($n=111$) in der Untersuchung des Panels an biochemischen Faktoren bei Patientinnen unter Mehrlinientherapie war eine aufwendigere statistische Aufarbeitung möglich. Der Vergleich des progressionsfreien Überlebens zwischen den s-HER-2/neu-positiven und den s-HER-2/neu-negativen Patientinnen erfolgte auch hier mit dem Log-Rank-Test bei $\alpha=0,05$. Die Parameter, die in den univariaten Analysen einen p-Wert $\leq 0,1$ lieferten, gingen dann in eine multivariate Cox-Regression ein. Der Vergleich

der Remissionsraten zwischen den s-HER-2/neu-positiven und den s-HER-2/neu-negativen Patientinnen erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Tests (Fisher's exact). Um Unterschiede (Gruppeneffekte, Zeiteffekte und Wechselwirkungen) der Monitoring-Verläufe für die Parameter s-HER-2/neu, s-EGFR, s-uPA und CA 27.29 zwischen den Patientinnen mit unterschiedlichem Remissionsstatus aufzuzeigen, wurde ebenso wie in der Table-Studie die nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Meßwiederholungen nach Brunner eingesetzt (siehe 4.13.3.).

4.13.6. Monitoring durch s-HER-2/neu unter Herceptin-Therapie

Die Berechnung von Unterschieden zwischen dem Serumverlauf von HER-2/neu und dem klinischen Ansprechen auf die Herceptin-Therapie erfolgte mit dem χ^2 -Test (Fisher's exact). Es wurden die Ereignisse einer Progression bzw. des Fehlens der Progression in Bezug zu einem mehr als 15%-igem Anstieg oder weniger als 15%-igem Anstieg von s-HER-2/neu im Vergleich zur letzten Voruntersuchung gesetzt. Dieser Ansatz diente zur ersten Analyse, bei welchem Anteil der Patientinnen unter Herceptin-Therapie der s-HER-2/neu-Spiegel relevant abfällt. Für die Analyse nach einem Zusammenhang zwischen response und Höhe des baseline-s-HER-2/neu-Spiegels (Gruppen <15 ng/ml und \geq 15 ng/ml beziehungsweise <15 ng/ml, 15-50 ng/ml und \geq 50 ng/ml) wurde ebenfalls der χ^2 -Test herangezogen.

Als klinisch relevanteste Frage wurde angesehen, wieviel der s-HER-2/neu-Spiegel in welchem Zeitraum abfallen muß, um frühzeitig den ausbleibenden Nutzen der Therapie anzuzeigen. Zunächst wurde mit Hilfe einer logistischen Regression gefragt, ob ein Bezug zwischen der binären response (Progression versus Nicht-Progression) und dem relativen Abfall der s-HER-2/neu-Konzentration zu den Wochen 2-3 und 3-5 besteht. Für diese beiden Gruppen wurde dann für den Fall des Bestehens einer solchen Abhängigkeit eine ROC-Kurve aufgestellt, an deren Koordinaten sich die Sensitivität und Spezifität für eine bestimmte relative s-HER-2/neu-Konzentration zu diesem Zeitpunkt ablesen ließ.

4.13.7. Verteilung von IHC des Primärtumors und s-HER-2/neu im Stadium IV

Zur Bestimmung der Verteilung von s-HER-2/neu-positiven Patientinnen in Abhängigkeit vom IHC-Status im Gewebe wurde eine Vierfeldertafel aufgestellt und mit dem χ^2 -Test die statistische Signifikanz berechnet.

4.13.8. Konkordanz von Immunhistochemie (mit ACIS), FISH und s-HER-2/neu

Die Konkordanz für die HER-2/neu-Gewebetestungen mittels unterschiedlicher Bestimmungsmethoden wurde mit dem Konkordanzindex Kappa (κ) ermittelt, der Ergebnisse von -1 bis 1 liefert. Eine übliche Interpretation für κ ist wie folgt: $\kappa < 0,1$: keine Konkordanz; $\kappa = 0,10-0,40$: Konkordanz schwach; $\kappa = 0,41-0,6$: Konkordanz deutlich; $\kappa = 0,61-0,8$: Konkordanz stark; $\kappa = 0,81-1,0$: Konkordanz fast vollständig (37). Wir testeten die Nullhypothese $H_0: \kappa = 0$, d. h. die Annahme, daß es zwischen den verschiedenen HER-2/neu-Gewebeergebnissen keine Übereinstimmungen gibt und wählten hierfür das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

Der McNemar-Test wurde zur Analyse der verschiedenen HER-2/neu-Gewebeergebnisse mit den s-HER-2/neu-Spiegeln im Stadium IV der Erkrankung benutzt. Diese Methode testet auf Änderungen von Wahrscheinlichkeiten (Nullhypothese H_0 : die Wahrscheinlichkeit für Unterschiede des Gewebeergebnisses im Vergleich zum Serumergebnis ist in beiden Richtungen identisch, d. h. Gewebe-negativ zu Serum-positiv und Gewebe-positiv zu Serum-negativ). Zwischen den metrischen Gewebeergebnissen auf dem ACIS-System und den metrischen s-HER-2/neu-Spiegeln wurde eine lineare Regression durchgeführt, der Pearson'schen Korrelationskoeffizient lieferte die Stärke des linearen Zusammenhangs.

5. Ergebnisse

5.1. Ermittlung des cut-off-Wertes für s-HER-2/neu

Die Ermittlung des cut-off-Wertes für s-HER-2/neu mußte dreimal mit drei verschiedenen Meßmethoden erfolgen: zunächst mit dem Chiron-Assay, der bis 1999 kommerziell verfügbar war und dann durch den Oncogene Science-Assay ersetzt wurde. Die Antikörper dieses zuletzt genannten Assays werden auch für die vollautomatisierte s-HER-2/neu-Messung auf dem klinisch-chemischen Analysenapparat Immuno 1 verwendet.

5.1.1. Chiron®-Assay

Um einen Eindruck zu gewinnen, in welchem Bereich der obere cut-off-Wert für s-HER-2/neu liegen dürfte, evaluierten wir zunächst ein gesundes Kontrollkollektiv von 54 Frauen aller Altersstufen, welche die Kriterien gesunder Blutspender erfüllten. Dabei zeigte sich für den Chiron-Assay, daß die Serumspiegel eine Konzentration von 10 U/ml nicht überschritten. Es ist zu beachten, daß das Testergebnis bei vielen Frauen bei 0 U/ml lag, was für die ungenügende Detektion des kits im niedrigen Konzentrationsbereich spricht (siehe Abbildung 9).

Die ROC-Kurve sprach eher für einen oberen cut-off von 10 U/ml als für den später gewählten oberen cut-off-Wert von 15 U/ml (siehe Tabelle 2 und Abbildung 10). Der Grund für diese Wahl ist vor allem in der genannten schlechten Detektion im niedrigen Konzentrationsbereich zu sehen. Auch andere Studiengruppen gingen ähnlich vor und legten den oberen cut-off-Wert von s-HER-2/neu mit diesem Assay bei 15 U/ml fest (38). Die später durchgeführte lineare Regression zwischen den Ergebnissen des Chiron-Assays und des Oncogene-Assays bestätigte diese Vorgehensweise.

Abbildung 9: Verteilung der s-HER-2/neu-Werte, gemessen mit dem Chiron-Assay, bei gesunden Frauen

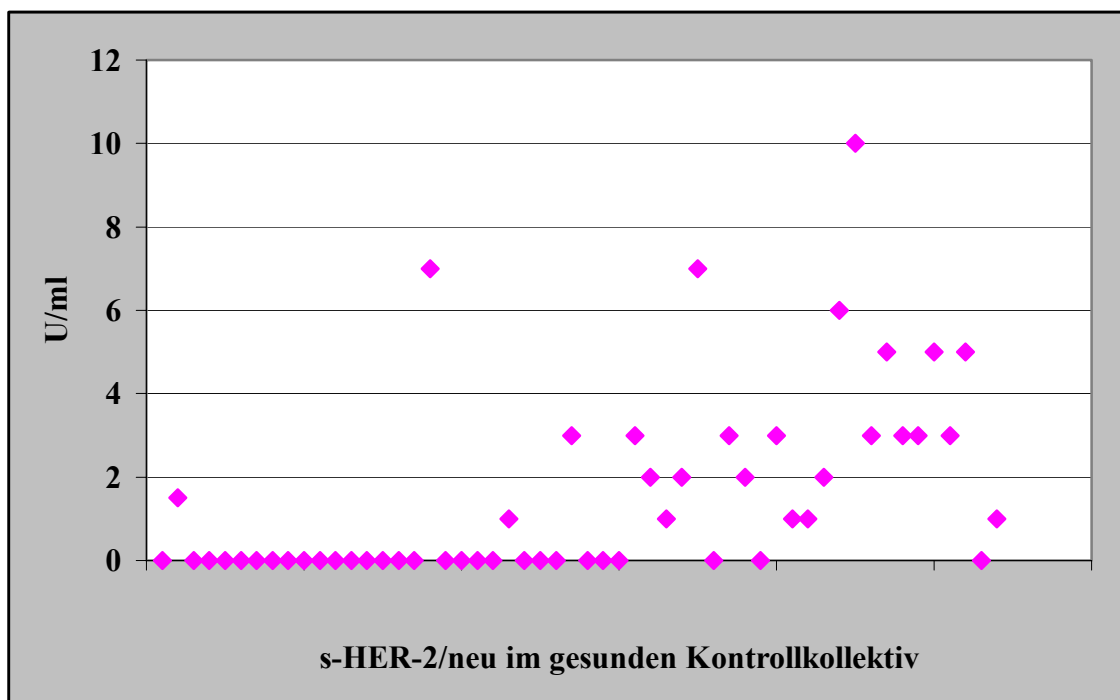
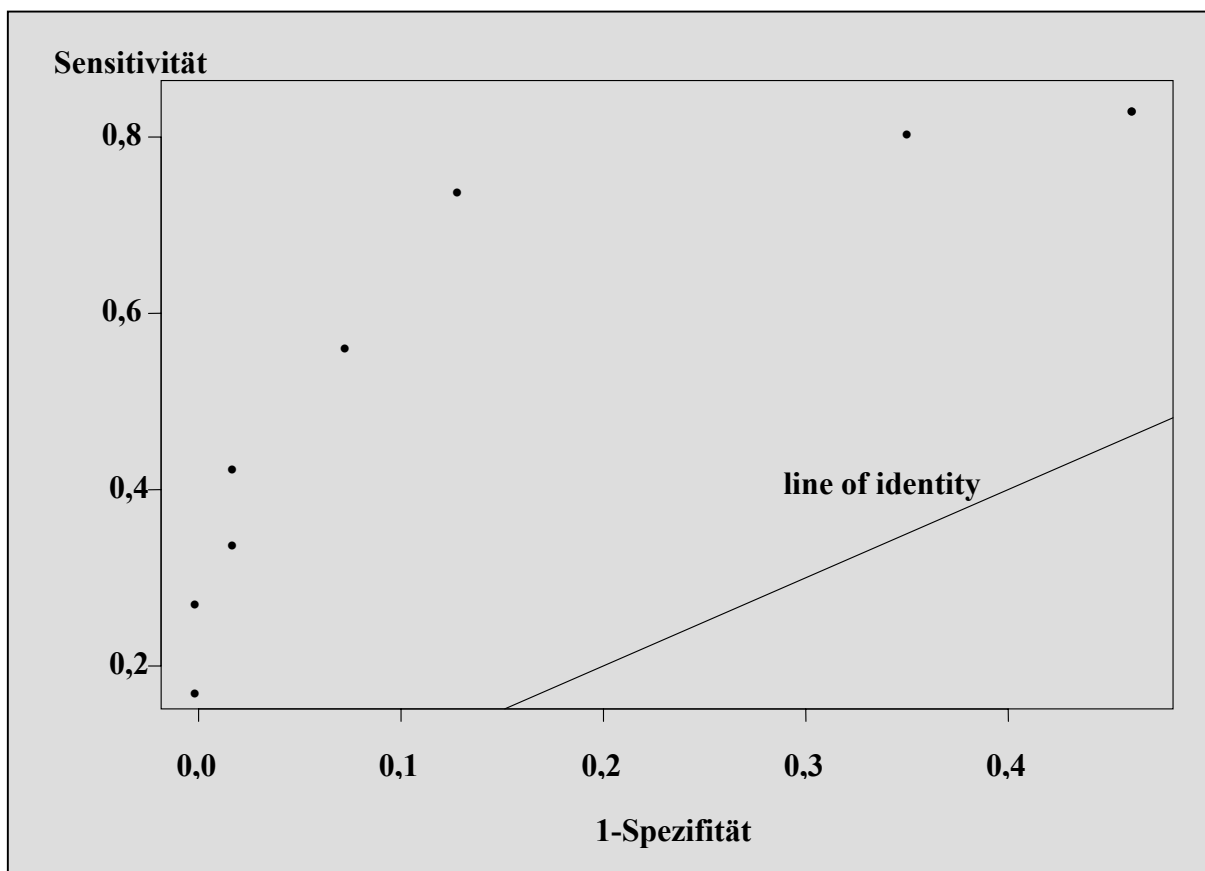


Tabelle 2: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-HER-2/neu mit dem Chiron-Assay

Chiron cut-off (U/ml)	2	4	6	8	10	12	20
Sensitivität (%)	81,2	74,6	56,8	43,2	34,5	29,9	17,8
Spezifität (%)	64,8	87,0	92,6	98,2	98,2	100	100
Positive Prädiktivität (%)	89,3	95,5	96,6	98,8	98,6	100	100
Negative Prädiktivität (%)	48,6	48,5	37,0	32,1	29,1	27,5	25,0
Accuracy (%)	77,7	77,3	64,5	55,0	48,2	43,4	35,5
Youden-Index (%)	46,0	61,6	49,5	41,3	32,7	30,0	17,8

Abbildung 10: ROC-Kurve zur cut-off-Ermittlung für den Chiron-Assay



5.1.2. Oncogene[®]-Assay

Der Oncogene-Assay ist im Vergleich zum Chiron-Assay wesentlich präziser, was die Abbildung 11 zeigt. Ein Messergebnis von 0 kommt nicht vor, bei allen gesunden Kontrollfrauen konnte ein Serumspiegel für HER-2/neu nachgewiesen werden. Auch für Männer kann ein Nachweis von HER-2/neu im Serum geführt werden (Daten nicht dargestellt). In der ROC-Analyse ergab sich für den Oncogene-Assay ein oberer Grenzwert für s-HER-2/neu von 15 ng/ml (siehe auch Tabelle 3 und Abbildung 12). Dieses monozentrisch evaluierte Ergebnis wurde später in der multizentrischen Evaluierung mit dem Immuno 1 exakt bestätigt.

Abbildung 11: Verteilung der s-HER-2/neu-Werte, gemessen mit dem Oncogene-Assay, bei gesunden Frauen

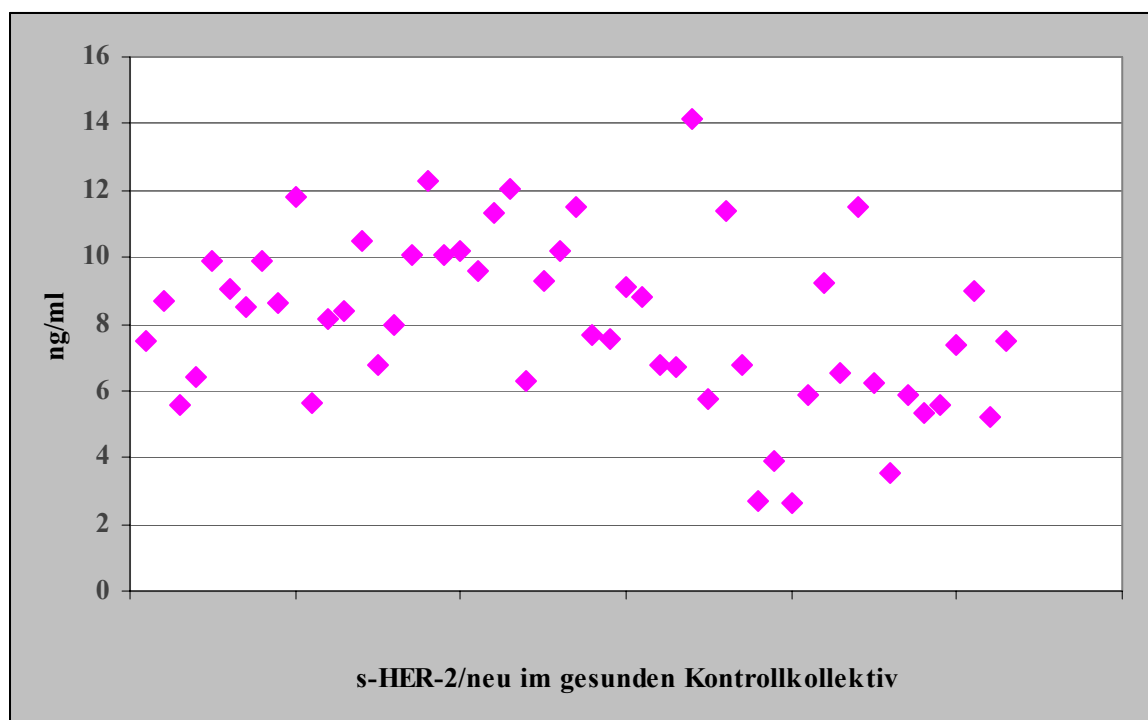
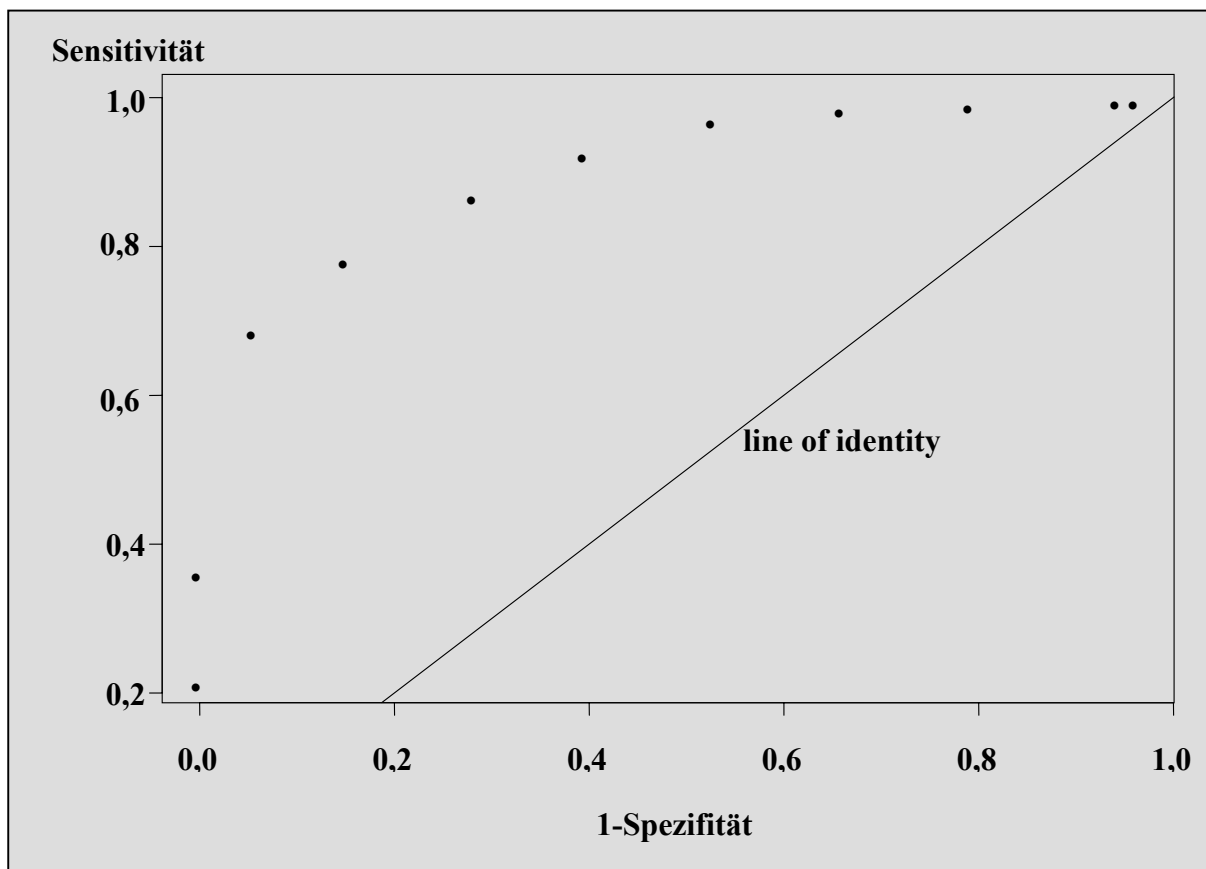


Tabelle 3: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-HER-2/neu mit dem Oncogene-Assay

Oncogene cut-off (ng/ml)	4	6	8	10	12	16	20
Sensitivität (%)	100	99,5	97,5	87,3	69,0	36,6	21,8
Spezifität (%)	5,6	20,8	47,2	71,7	94,3	100	100
Positive Prädiktivität (%)	79,7	82,4	87,3	92,0	97,8	100	100
Negative Prädiktivität (%)	100	91,7	83,3	60,3	45,0	29,8	25,6
Accuracy (%)	80,0	82,8	86,8	84,0	74,4	50,0	38,4
Youden-Index (%)	5,7	20,3	44,6	59,0	63,4	36,5	21,8

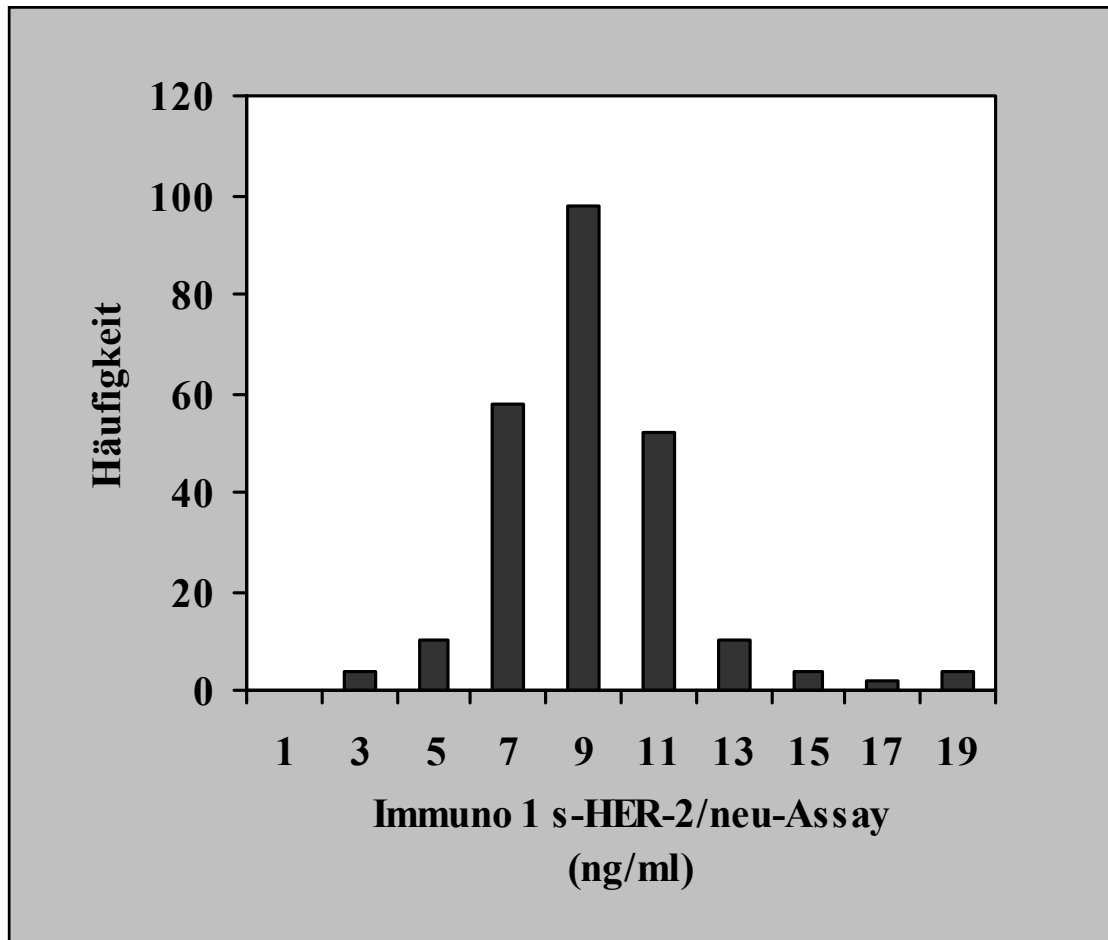
Abbildung 12: ROC-Kurve zur Grenzwertermittlung für den Oncogene-s-HER-2/neu-Assay



5.1.3. Immuno 1[®]-Plattform

In der multizentrisch eingebrachten Population von 242 gesunden Frauen lagen 95% der s-HER-2/neu-Ergebnisse unter 13 ng/ml. Gemäß den Vorgaben lag der obere cut-off-Wert bei 14,7 ng/ml. In einer ähnlich konzipierten Studie war ebenfalls das gleiche Resultat erzielt worden (39). Die Verteilung der s-HER-2/neu-Spiegel für das gesamte Kontrollkollektiv ist in Abbildung 13 dargestellt.

Abbildung 13: Verteilung der s-HER-2/neu-Konzentrationen bei gesunden Frauen (25;40)



Im nächsten Schritt wurde die Verteilung der s-HER-2/neu-Ergebnisse von Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen und von Frauen mit chronischen Erkrankungen evaluiert und mit dem gesunden Kontrollkollektiv verglichen. Die Spezifität des Immuno 1-Assays lag bei dem ermittelten s-HER-2/neu-cut-off-Wert von 15 ng/ml für das Kontrollkollektiv bei 97,5% und für die Frauen mit benignen Brusterkrankungen bei 98,0% (siehe Tabelle 4). Für alle chronischen Erkrankungen lag die Spezifität bei 94,6%.

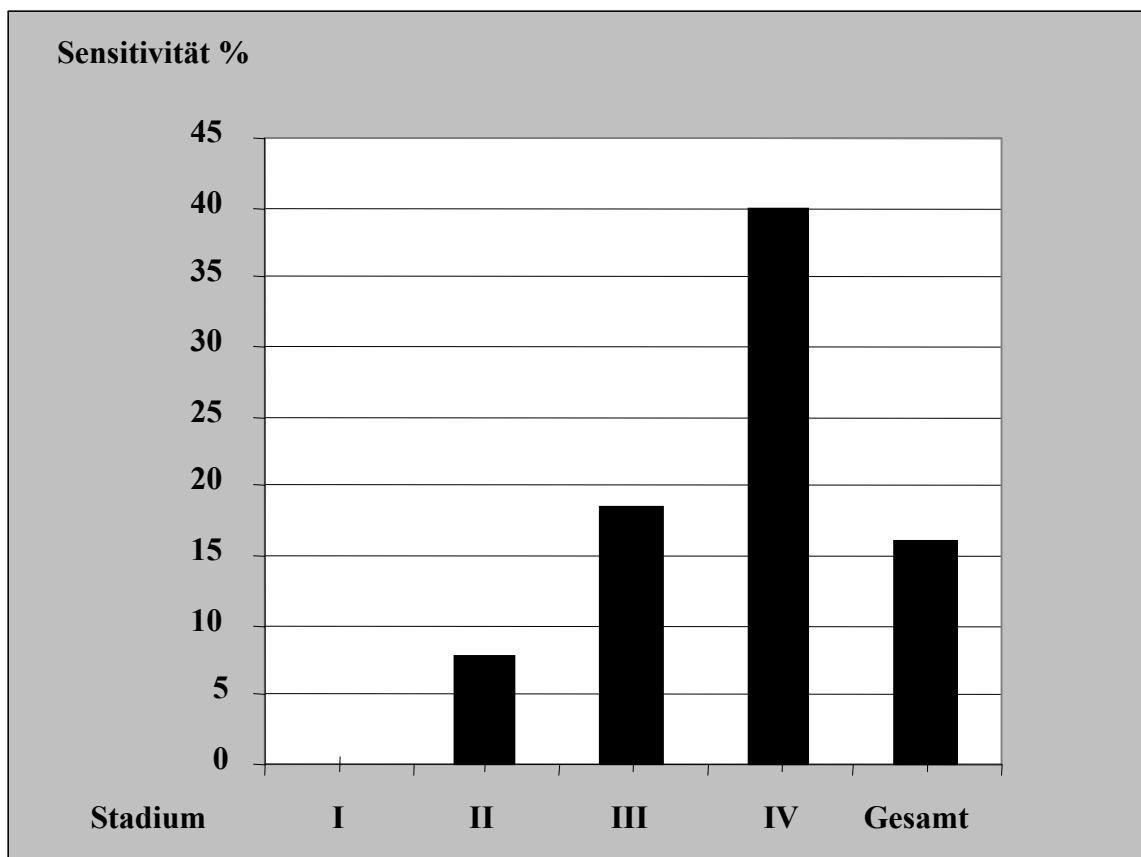
Tabelle 4: Spezifität des Immuno 1-s-HER-2/neu-Assays für den cut-off-Wert von 15 ng/ml (25;40)

	Normale Kontrollen	Benigne Brust- erkrankungen	Andere benigne Erkrankungen	Gesamt
Spezifität	97,5%	98,0%	94,6%	96,9%
	RN = 273	RN = 98	RN = 104	RN = 475
	FP = 7	FP = 2	FP = 6	FP = 15
95% CI	94,9-98,9	93,0-99,8	88,5-98,0	95,0-98,3

RN= Richtig Negative; FP= Falsch Positive; Spezifität = $RN / (RN + FP)$; CI = Konfidenzintervall

Die Sensitivität des Immuno 1-s-HER-2/neu-Assays für die unterschiedlichen Stadien des Mammakarzinoms wurde an 204 Patientinnen (53 Frauen im Stadium I, 52 Frauen im Stadium II, 49 Patientinnen im Stadium III und 50 Frauen im Stadium IV) untersucht. Die medianen und mittleren s-HER-2/neu-Spiegel waren für die Untergruppen wie folgt verteilt: gesunde Frauen: 9,0 und 9,2 ng/ml; benigne Brusterkrankungen: 9,3 und 9,6 ng/ml; Mammakarzinom in den Stadien I/II: 9,8 und 10,7 ng/ml; Mammakarzinom im Stadium III: 10,3 und 10,7 ng/ml. Damit lag die Sensitivität des Immuno 1-s-HER-2/neu-Assays für das Mammakarzinom unabhängig vom Stadium bei 16% (95% CI: 11,4–22,0). Die Sensitivität stieg mit dem Stadium von 0% für das Stadium I bis auf 40% für das Stadium der Fernmetastasierung an. Dabei lag im Stadium IV der Median immer noch niedrig bei 12,5 ng/ml, der Mittelwert war allerdings auf 75,2 ng/ml angestiegen (siehe Abbildung 14). Diese Sensitivität des Immuno 1-Assays für das Mammakarzinom im Stadium IV von 40% (95% CI: 26,4–54,8) weist auf den klinischen Nutzen der s-HER-2/neu-Bestimmung für die Verlaufsbeobachtung von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom hin.

Abbildung 14: Sensitivität von s-HER-2/neu für den cut-off-Wert von 15 ng/ml in bezug auf das Stadium des Mammakarzinoms (25;40)

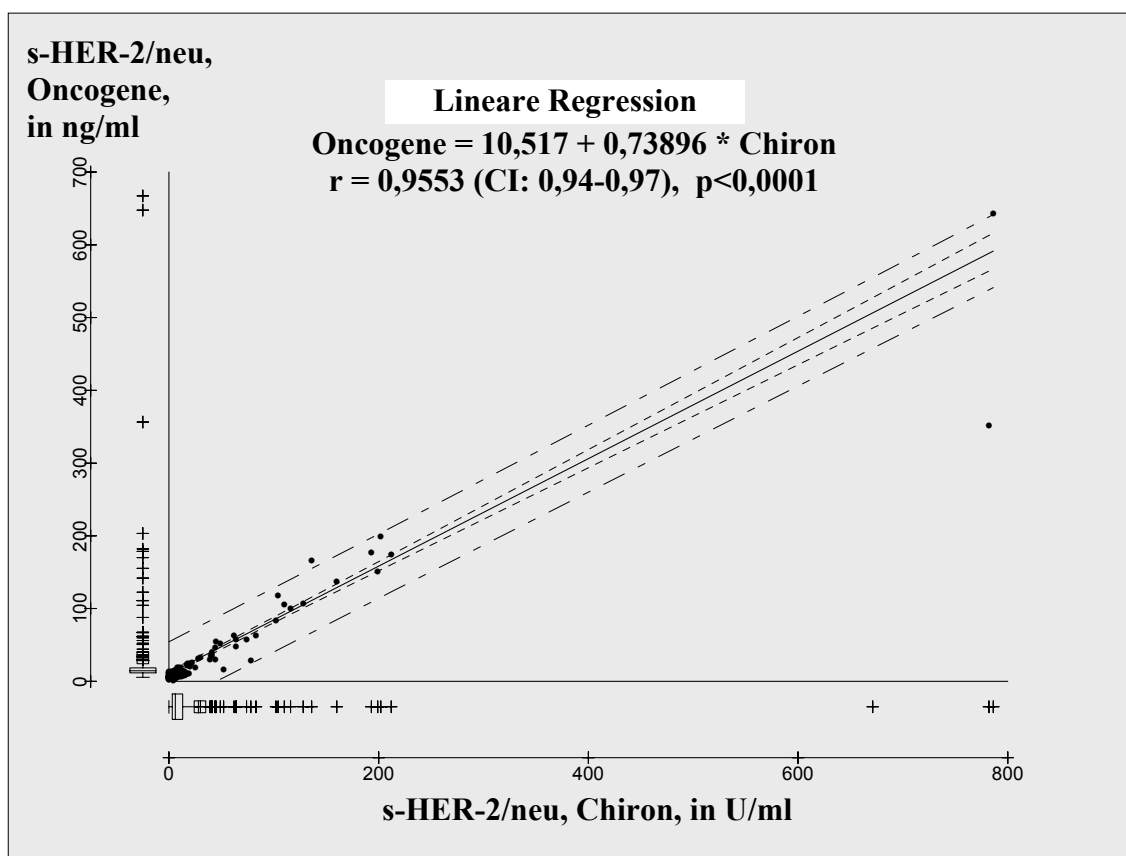


5.2. Korrelation der verschiedenen Methoden der s-HER-2/neu-Bestimmung

Wie im Vorfeld dargestellt, kamen insgesamt 2 manuelle ELISA-Assays zur Bestimmung von s-HER-2/neu zum Einsatz. Zu Beginn der Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel war der Chiron-Assay kommerziell verfügbar und auch in anderen klinischen Studien mit wichtigen Ergebnissen zum Einsatz gekommen (41;42). Im Studienverlauf wurde der Chiron-Assay vom Markt genommen, was uns dazu veranlaßte, auf den Oncogene-Assay zu wechseln und generell die Serumergebnisse der beiden Assays als Qualitätskontrolle zueinander zu korrelieren (siehe Abbildung 15). Obwohl sich beide kits in einigen technischen Aspekten (Wellenlänge zur photometrischen Messung, Antikörper, Einheit des Endergebnisses) unterscheiden, ist die Korrelation doch sehr gut. In dieser linearen Regression verglichen wir 260 longitudinale Oncogene- und Chiron-s-

HER-2/neu-Meßergebnisse von 73 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, inklusive aller Patientinnen unter wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel. Der Korrelationsfaktor von $r=0,96$ (CI: 0,94-0,97; $p<0,0001$) spiegelt die generell sehr hohe Qualität der standardisierten s-HER-2/neu-Messung wieder, was für die spätere Diskussion der Reliabilität der verschiedenen Methoden der HER-2/neu-Bestimmung wichtig ist. Schon in der nachfolgenden Darstellung zeigt sich, daß wenige Mammakarzinompatientinnen erhöhte s-HER-2/neu-Spiegel >500 ng/ml aufweisen und wahrscheinlich eine biologische Subgruppe darstellen, hier aber in der Statistik der cut-off-Ermittlung nicht separat betrachtet werden sollen.

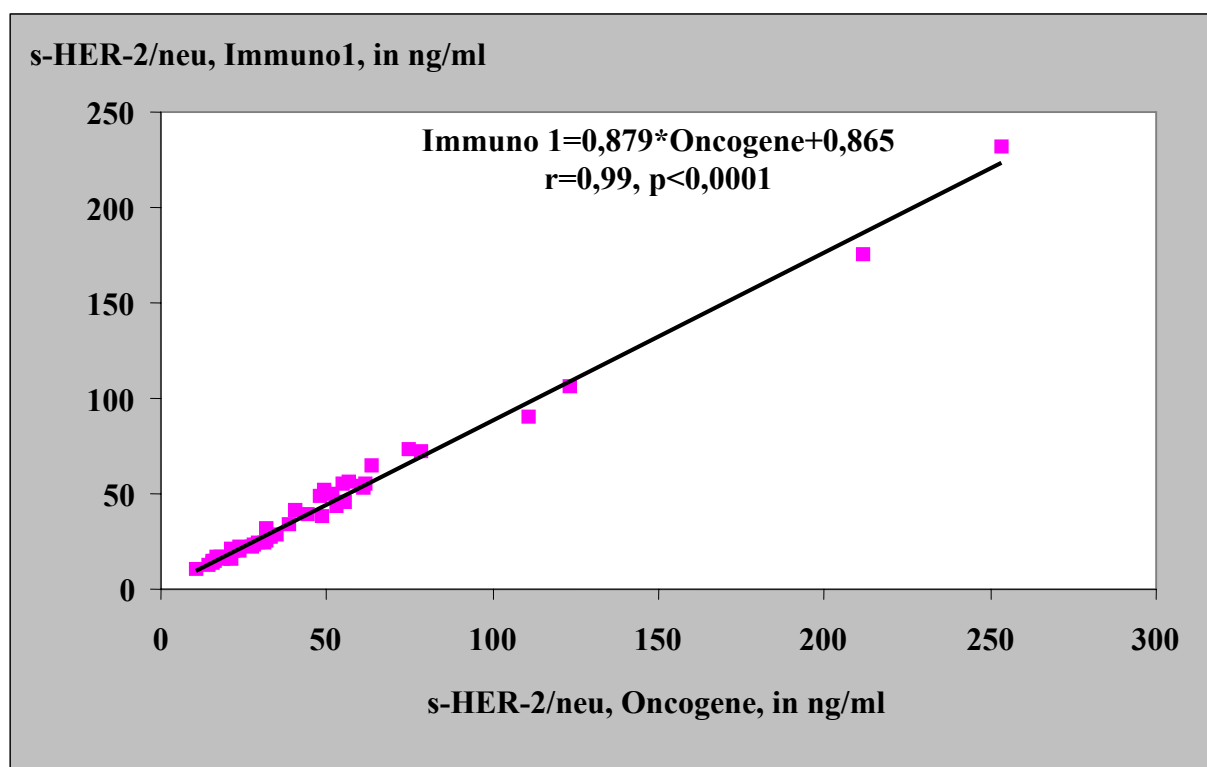
Abbildung 15: Korrelation der s-HER-2/neu-Bestimmungen mit dem Oncogene- und dem Chiron-Assay



Aus den Serumproben der Table-Studie (siehe unten) wurde zudem eine Korrelationsanalyse zwischen den s-HER-2/neu-Ergebnissen mittels Immuno 1-Assay und Oncogene-Assay durchgeführt. Die Seren aus der Table-Studie wurden alle mit dem

Immuno 1-Assay gemessen. Gleichzeitig wurde jede 10. Probe mit dem manuellen Oncogene-Assay verarbeitet. Da alle Seren aus der Table-Studie Konzentrationen im niedrigen Bereich aufwiesen, wurden sie durch weitere Seren ergänzt, um die Regressionsanalyse bis zum Konzentrationsbereich von 250 ng/ml führen zu können. Die Abbildung 16 zeigt die lineare Regression zwischen diesen aktuell verfügbaren Methoden zur Bestimmung von HER-2/neu im Serum, die statistisch hochsignifikant miteinander korrelieren ($p < 0,0001$). Auch diese ausgezeichnete Korrelation spricht für die hohe Objektivität der Serummessung von HER-2/neu an sich und erlaubt nicht nur, die in der Literatur mit standardisierten Assays publizierten Ergebnisse zu s-HER-2/neu weiterhin zu berücksichtigen, sondern direkt miteinander zu vergleichen.

Abbildung 16: Korrelation der s-HER-2/neu-Bestimmungen mit dem Oncogene- und dem Immuno 1-Assay



5.3. Einfluß von Herceptin auf die Messung von s-HER-2/neu

In vivo ist eine Komplexbildung von Herceptin und der extrazellulären Domäne von HER-2/neu im Serum beschrieben worden (23;43). Diese Reaktion dürfte aber nur bei sehr hohen Konzentrationen von s-HER-2/neu pharmakologisch relevant sein. *In vitro* konnte kein Absinken der s-HER-2/neu-Konzentration durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von Herceptin festgestellt werden (27). Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse einer Verdünnungsreihe von 3 Seren (1 gesunde Kontrollperson mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel, 2 Mammakarzinompatientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel) unter steigender Herceptin-Exposition. Es konnte kein Einfluß durch Zugabe von Herceptin auf das Meßergebnis festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten wir auch *in vivo* in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schaller, ehemals Frauenklinik im Klinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, erheben. Hier wurde aus Blutentnahmen jeweils vor und nach der Herceptin-Erstgabe der s-HER-2/neu-Spiegel bestimmt. Bei allen Messungen ergab sich unabhängig von der Höhe des baseline-Spiegels ein identisches Ergebnis. Diese Resultate werden demnächst in Vollversion dargestellt werden.

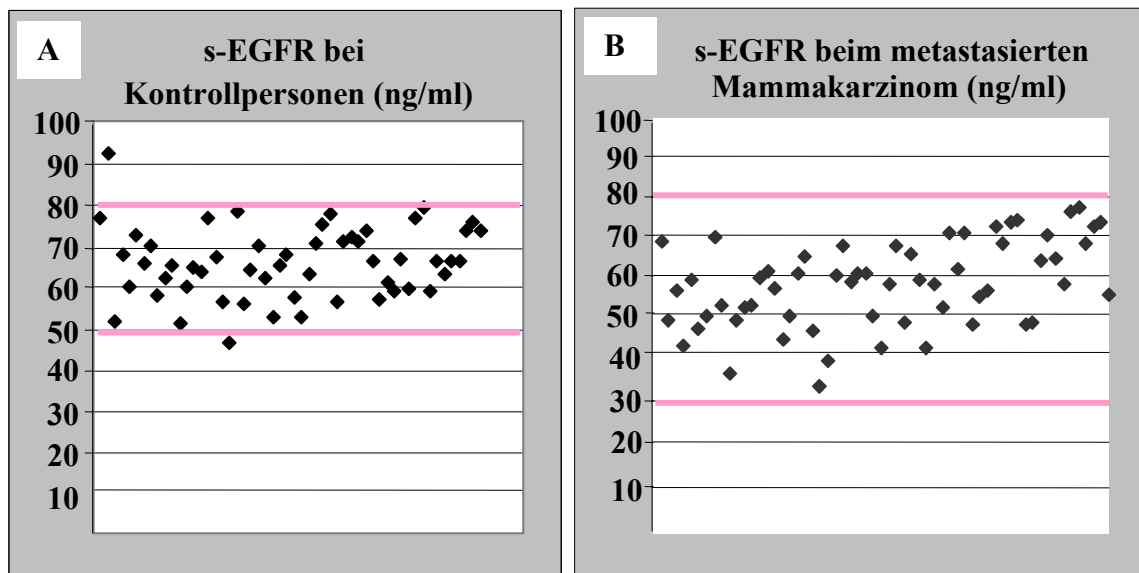
Tabelle 5: Messung von s-HER-2/neu in einer Verdünnungsreihe mit steigender Herceptin-Konzentration (27)

Herceptin (µg/l)	Kontrollperson		Patientin 1		Patientin 2	
	s-HER-2/neu	%	s-HER-2/neu	%	s-HER-2/neu	%
0	8,5	100	37,7	100	54,1	100
53	8,6	101	38,2	101	54,2	100
105	8,6	101	38,3	102	54,3	101
200	8,6	101	38,3	102	54,6	101
420	8,5	100	38,1	101	54,2	100

5.4. Ermittlung des cut-off-Bereiches für s-EGFR

Die Verteilung der s-EGFR-Konzentrationen erbrachte unerwartete Ergebnisse: Im Gegensatz zu s-HER-2/neu als Onkoprotein aus der gleichen Rezeptorfamilie zeigten viele Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom erniedrigte Werte im Vergleich zu dem Normalkollektiv (siehe Abbildung 17). Dies ist insofern bemerkenswert, als dies auf eine Downregulation von EGFR bei einer Subgruppe der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom hinweisen könnte. Während die s-EGFR-Spiegel bei Normalpersonen im allgemeinen zwischen 50-80 ng/ml lagen, streuten die s-EGFR-Spiegel bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zwischen 30-80 ng/ml.

Abbildung 17: Verteilung von s-EGFR bei Kontrollpersonen (A) sowie Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (B)



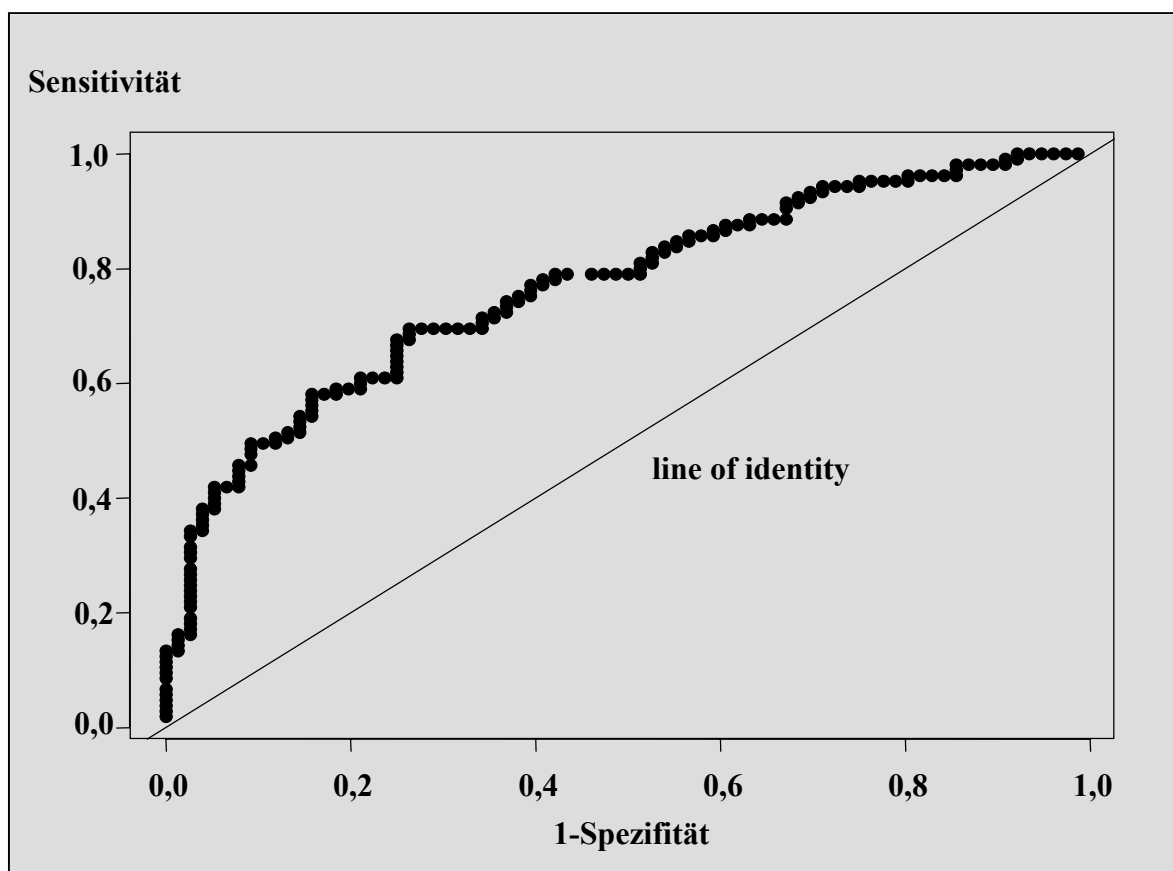
Die statistischen Berechnungen erbrachten einen cut-off-Bereich für s-EGFR von 52-76 ng/ml. EGFR-Spiegel im Serum unter diesem cut-off müssen als pathologisch niedrig interpretiert werden. Dieser cut-off-Bereich wurde anhand der 95%-Perzentilen für die Sensitivität und die Spezifität ermittelt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-EGFR

s-EGFR (ng/ml)	48,6	52,0	58,0	64,0	70,2	76,0	80,2
Sensitivität (%)	27,6	39,1	54,3	71,4	86,7	95,2	99,1
Spezifität (%)	97,4	94,8	84,2	65,8	40,8	19,7	7,9
Positive Prädiktivität (%)	93,6	91,1	82,6	74,3	66,9	62,1	59,8
Negative Prädiktivität (%)	49,3	52,9	57,1	62,5	68,9	75,0	85,7
Accuracy (%)	57,0	62,4	66,9	69,1	67,4	63,5	60,8
Youden-Index (%)	25,0	33,8	38,5	37,2	27,5	15,0	6,9

Abbildung 18 zeigt die ROC-Kurve zur Grenzwertermittlung für s-EGFR. Wie bereits die statistischen Angaben in Tabelle 6 anzeigen, ist die Unterscheidung von Normalpersonen und Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nur bedingt gut möglich.

Abbildung 18: ROC-Kurve zur cut-off-Bestimmung für s-EGFR



5.5. Ermittlung des cut-off-Bereiches für s-uPA

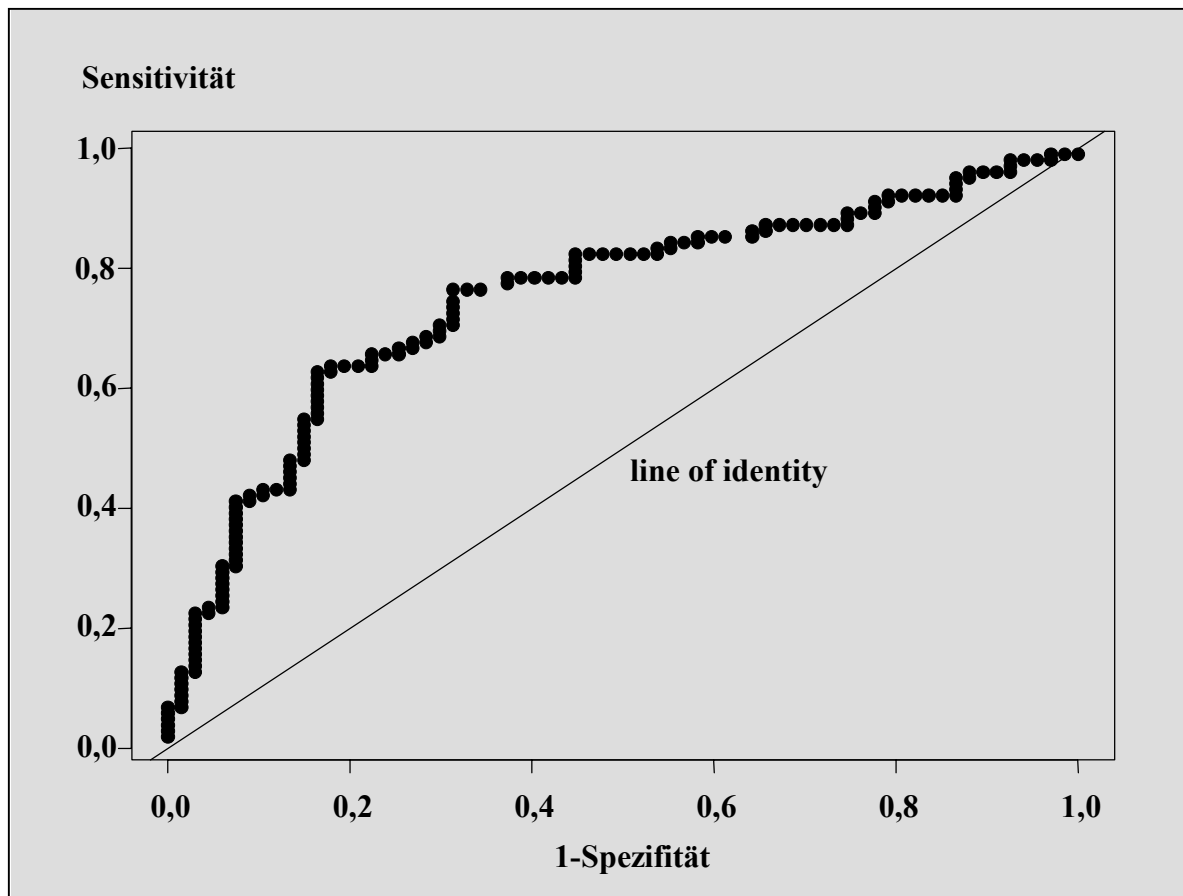
Der Serumspiegel von uPA wurde für diese biochemische Analyse als weiterer Marker gewählt. Dieses Protein gilt als mitverantwortlich für die Destruktion von Interzellulärsubstanz und damit für das allgemeine Metastasierungspotential eines Tumors. Es ergänzt somit die Palette aus dem klassischen Tumormarker CA 27.29 und den Wachstumsfaktoren EGFR und HER-2/neu. Die statistischen Angaben, die zur Ermittlung des cut-off-Bereiches von s-uPA herangezogen wurden, sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für s-uPA

s-uPA (pg/ml)	702	857	1132	1324	1530	1830	2202
Sensitivität (%)	99,0	93,1	82,4	63,7	43,14	23,5	16,7
Spezifität (%)	3,0	13,4	52,3	82,1	89,6	95,5	97,0
Positive Prädiktivität (%)	60,8	62,1	72,4	84,4	86,3	88,9	89,5
Negative Prädiktivität (%)	66,7	56,3	66,1	59,8	50,9	45,1	43,3
Accuracy (%)	61,0	61,5	70,4	71,0	61,5	52,1	48,5
Youden-Index (%)	2,0	6,6	34,6	45,8	32,7	19,1	13,7

Auch s-uPA eignet sich nur bedingt zur Unterscheidung von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und einem Kontrollkollektiv. Wie der nächste Unterpunkt zeigen wird, zeigt CA 27.29 als bereits etablierter Tumormarker den besten Verlauf der ROC-Kurve mit größerer Fläche unter der Kurve. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei HER-2/neu, EGFR und uPA um tumorassoziierte Proteine handelt, die dem Einfluß einer Vielzahl von Regulationsmechanismen unterliegen dürften, während für CA 27.29 relevante regulative Prozesse nicht nachgewiesen werden konnten. Abbildung 19 zeigt die ROC-Kurve für die Qualität der Trennung von Normalpersonen und Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom anhand der s-uPA-Werte. Ermittelt wurde anhand dieser Daten ein cut-off-Bereich von 857-1830 pg/ml.

Abbildung 19: ROC-Kurve zur cut-off-Ermittlung für s-uPA



Abschließend zu diesem Punkt soll erwähnt werden, daß für die Bestimmung von PAI-1 als Gegenspieler von uPA das Serummaterial nicht ausreichte, da jedes aliquot nur einmal aufgetaut werden durfte, um keine freeze-and-thaw-Effekte zu produzieren. Grundsätzlich liegt ein kit für den Komplex beider Proteine vor, mit dem wir zumindest eine der im Anhang beschriebenen prospektiven Studien („1-3-LK-Studie“ der Nordostdeutschen Gesellschaft für Gynäkologische Onkologie, Projekt 5) aufarbeiten werden.

5.6. Ermittlung des cut-off-Wertes für CA 27.29

Die Serumwerte von CA 27.29 wurden im Gegensatz zu allen anderen Markern mit Hilfe eines klinisch-chemischen Analysenapparates auf Chemilumineszenzbasis gemessen. CA 27.29 gilt als „amerikanisches Pendant“ zu CA 15-3, da in den USA CA 27.29 als Standard etabliert ist, während in Europa CA 15-3 bevorzugt wird. In einer kürzlich publizierten Multicenterstudie, an der auch die eigene Studiengruppe beteiligt war, konnte die Gleichwertigkeit der beiden Marker bestätigt werden (44). In niedrigen Konzentrationsbereichen war CA 27.29 dem CA 15-3 sogar überlegen.

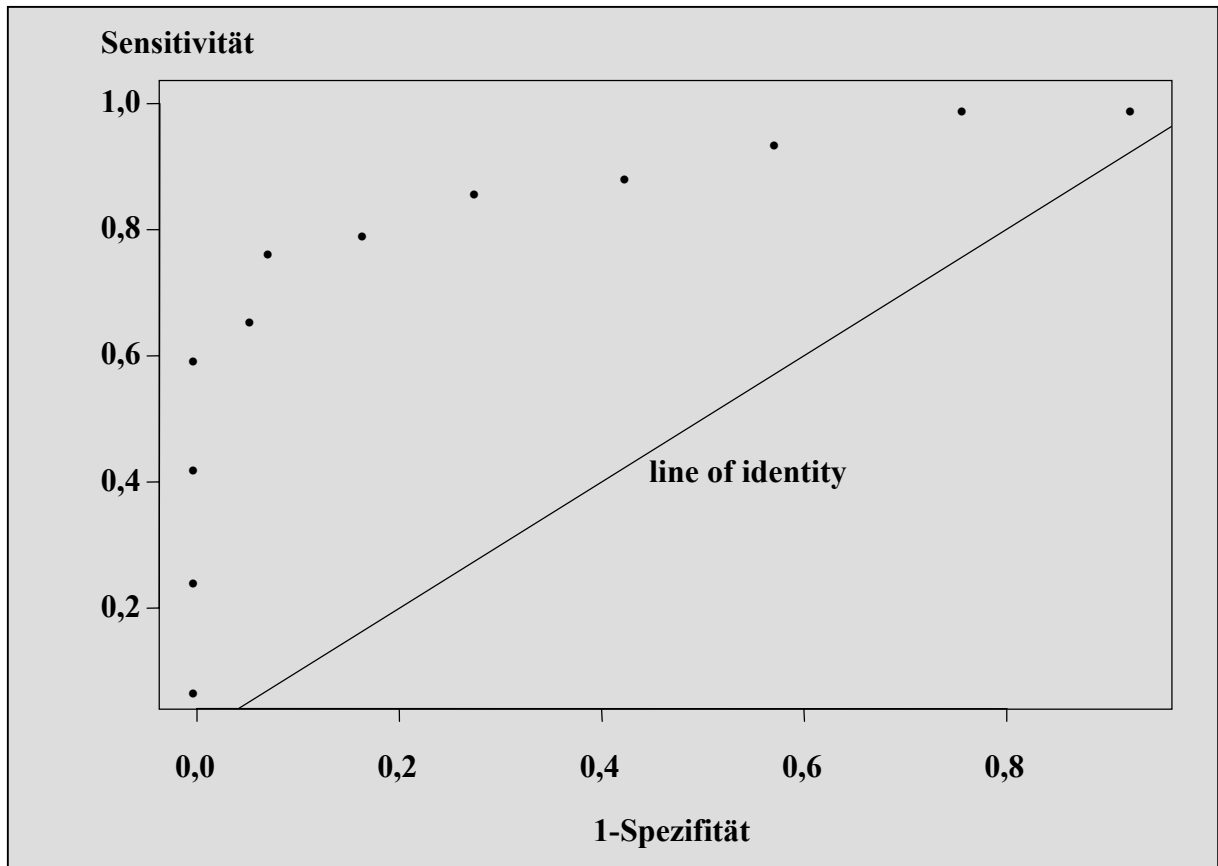
Tabelle 8 zeigt die statistischen Berechnungen für die Ermittlung des oberen cut-off-Wertes für CA 27.29, welcher bei 30 U/ml definiert werden konnte.

Tabelle 8: Statistische Grundlagen zur cut-off-Ermittlung für CA 27.29

CA 27.29 cut-off (U/ml)	15	18	21	24	30	36	60
Sensitivität (%)	89,2	86,8	80,2	77,3	66,5	60,5	43,1
Spezifität (%)	57,4	72,2	83,3	92,6	94,4	100	100
Positive Prädiktivität (%)	86,6	90,6	93,7	97,0	97,4	100	100
Negative Prädiktivität (%)	63,3	63,9	57,7	56,8	47,7	45,0	36,2
Accuracy (%)	81,5	83,3	81,0	81,0	73,3	70,1	57,0
Youden-Index (%)	46,6	59,0	63,6	69,8	60,9	60,5	43,1

Die ROC-Kurve zur Grenzwertermittlung von CA 27.29 zeigt im Vergleich zu den zuvor abgebildeten ROC-Kurven für s-HER-2/neu, s-EGFR und s-uPA den besten Verlauf (siehe Abbildung 20). Dies steht im Einklang mit den später dargestellten Ergebnissen zum Vergleich der Monitoringqualität aller benutzten Serummarker (siehe Kapitel 5.8.2.).

Abbildung 20: ROC-Kurve zur cut-off-Ermittlung für CA 27.29



5.7. s-HER-2/neu im Rahmen der Table-Studie

In verschiedenen Untersuchungen an Mammakarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, daß die Überexpressionen von HER-2/neu und des Östrogenrezeptors (ER) invers korreliert sind (45;46). Das klinische Äquivalent dieser reziproken Regulation ist der kleine Anteil (10-15%) ER-positiver und gleichzeitig HER-2/neu-positiver Mammakarzinome (47-50). Ursache für dieses Phänomen ist eine Östrogen-sensitive Bindungsstelle am Promotor des HER-2/neu-Gens, welche für die Transkriptionsrate von HER-2/neu mitverantwortlich ist und die Expression des HER-2/neu-Proteins bei hohen Östrogenspiegeln supprimiert (51;52). Umgekehrt steigt die Expression von HER-2/neu sowohl unter Östrogenentzug als auch unter Tamoxifenexposition an (53-55). Die für die klinische Praxis und Therapieentscheidung allerdings wichtigste Information kommt aus *in*

vivo-Untersuchungen an primären Mammakarzinomen, bei denen sich eine vergleichbare Variation der HER-2/neu-Expression während des Menstruationszyklus gezeigt hat (56). Damit könnte der Zeitpunkt der Operation während des Menstruationszyklus das HER-2/neu-Gewebeergebnis in der Immunhistochemie (IHC) mitbestimmen. Wenn man bedenkt, daß Patientinnen mit HER-2/neu-positivem Mammakarzinom im Falle der Fernmetastasierung für eine Herceptin-Therapie qualifizieren, könnte insbesondere bei prämenopausalen Patientinnen das IHC-HER-2/neu-Gewebeergebnis ggf. irreführend sein.

Die folgenden Daten stammen aus einer Begleituntersuchung zur Table-Studie und hinterfragen, ob eine ovarielle Ablation als adjuvante Therapie des primären Mammakarzinoms zu einer Hochregulation von (s-)HER-2/neu führt. Diese Hochregulation käme in diesem Ansatz nicht notwendigerweise von residuellen Mammakarzinomzellen, sondern generell aus den übrigen HER-2/neu-exprimierenden Organen epithelialen Ursprungs. Der Vorteil der HER-2/neu-Messung im Serum liegt dabei in der Möglichkeit der longitudinalen Untersuchung, während gewebebasierte Testmethoden wie IHC oder FISH von der Verfügbarkeit von Tumorgewebe abhängen und damit im allgemeinen auf einen einzigen Zeitpunkt beschränkt bleiben (57). Insofern ist die s-HER-2/neu-Messung auch die einzige Methode, die risikofrei die Beurteilung von Veränderungen des HER-2/neu-Status erlaubt.

Im Rahmen der Table-Studie wurden die Wirksamkeit und Verträglichkeit des GnRH-Analogons Leuprorelin im Vergleich zu einer CMF-Chemotherapie als adjuvante Therapie des nodalpositiven Mammakarzinoms untersucht. Im Studienverlauf wurden für endokrinologische und pharmakologische Untersuchungen zu den Zeitpunkten 0 und nach jeweils 3, 6, 12, 18 und 24 Monaten Seren gesammelt, die wir retrospektiv auf s-HER-2/neu und CA 27.29 aufmaßen. Zusätzlich stand nach einem follow-up von 6 Monaten eine zusätzliche Probe von Patientinnen nach Leuprorelintherapie zur Verfügung. Wir stellten die folgenden Fragen an unser Begleitprojekt: Wird s-HER-2/neu während einer hormonellen Ablation durch CMF oder Leuprorelin relevant hochreguliert? Gibt es ggf. Unterschiede in der Regulation zwischen den beiden Therapiearmen? Wann findet diese Hochregulation in Bezug zum Abfall des Östrogenspiegels statt? Ist die Regulation

reversibel nach Absetzen von Leuporelin? Hat der Serumspiegel von HER-2/neu eine prognostische bzw. prädiktive Wertigkeit für den Erfolg der adjuvanten Therapie?

5.7.1. Regulation von s-HER-2/neu während ovarieller Ablation

Aus der Table-Studie standen von 80 Patientinnen aus dem Leuporelin-Arm und von 53 Patientinnen aus dem CMF-Arm Seren zur Verfügung. Beide Gruppen waren in bezug auf ihre demographischen Daten ausgeglichen (siehe Tabelle 9). Für die Statistik zu den Serumergebnissen teilten wir die Leuporelin-Patientinnen aus Sicherheitsgründen nochmals in 2 Untergruppen auf: Im Leuporelin-Arm waren gehäuft Patientinnen aus der Ukraine enthalten, da laut Protokoll bevorzugt von diesen Frauen eine Pharmakokinetik abgenommen werden sollte. Sie könnten eine besonders ungünstige Untergruppe darstellen, worauf auch die Ergebnisse zum Tumormarker CA 27.29 hinwiesen. Insofern wird im folgenden mehrfach in die Gruppen A (Leuporelinpatientinnen ohne Berücksichtigung der Ukraine), Gruppe B (CMF-Patientinnen) und Patientinnen unter Leuporelin-Therapie aus der Ukraine unterschieden.

Die s-HER-2/neu-baseline-Spiegel waren bei den Leuporelin-Patientinnen (8,1 ng/ml) und bei den CMF-Patientinnen (8,2 ng/ml) gleich. Während der Gesamtdauer der Table-Studie stieg der mittlere s-HER-2/neu-Spiegel in beiden Gruppen statistisch signifikant an ($p < 0,0001$; siehe Tabelle 10 und Abbildung 21). Es ist zu beachten, daß dieser Anstieg absolut ca. ein Drittel des Eingangswertes ausmachte, was für s-HER-2/neu in diesen niedrigen Konzentrationen als sehr viel zu betrachten ist. Eine Patientin aus der Ukraine-Leuporelin-Gruppe mit einem für die Primärsituation ungewöhnlich hohen baseline-s-HER-2/neu-Spiegel von 139 ng/ml wurde aus dieser Analyse herausgenommen, da sie insbesondere die Statistik der Mittelwerte verfälscht hätte.

Tabelle 9: Demographische Angaben zu den Patientinnen im s-HER-2/neu-Projekt zur Table-Studie

	Gesamt		Leuprorelin		CMF	
	n=133	%	n=80	%	n=53	%
<i>Alter in Jahren</i>						
Median	44		44		44	
Range	29-55		29-55		30-54	
<i>Tumorgröße</i>						
pT1	49	36,8	27	33,8	22	41,5
pT2	75	56,4	48	60	27	50,9
pT3	9	6,8	5	6,2	4	7,6
<i>Positive Lymphknoten</i>						
1-3	105	79,5	61	77,2	44	83,0
4-9	27	20,5	18	22,8	9	17,0
<i>Östrogenrezeptor</i>						
Positiv	129	97	78	97,4	51	96,2
Negativ	3	2,3	1	1,3	2	3,8
Unbekannt	1	0,7	1	1,3		
<i>Progesteronrezeptor</i>						
Positiv	109	82	62	77,5	47	88,7
Negativ	13	9,8	7	8,8	6	11,3
Unbekannt	11	8,2	11	13,7		
<i>ER & PgR positiv</i>	115	78,9	60	57,1	45	84,9
<i>Operation</i>						
Mastektomie	59	44,4	38	47,5	21	39,6
Brusterhaltend	74	55,6	42	52,5	32	60,4
<i>Adjuvante Bestrahlung</i>	34	26,2	28	35,9	6	11,5

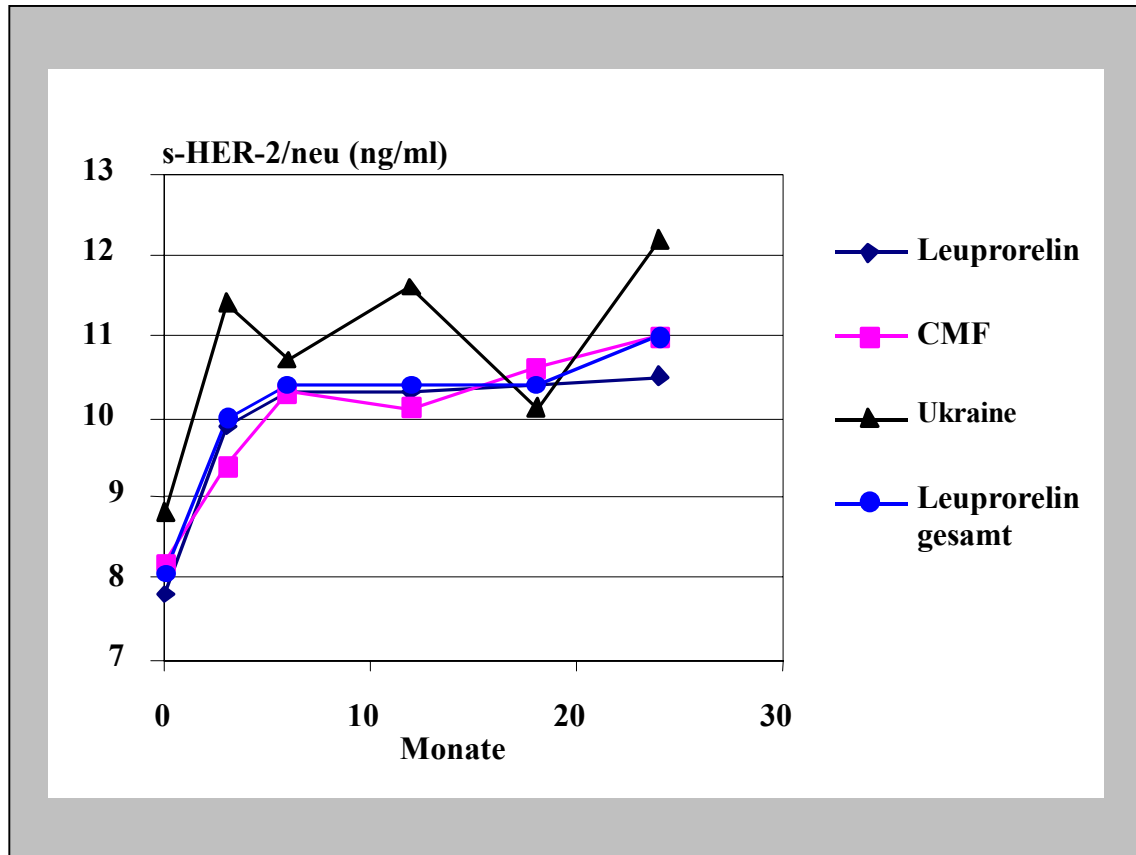
Tabelle 10: Modulation von s-HER-2/neu (ng/ml) unter hormoneller Ablation

Gruppe A: Leuprorelin	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	
Mittelwert	7,8	9,9	10,3	10,3	10,4	10,5	
SD	1,94	2,12	2,16	2,17	2,24	2,40	
Gruppe B: CMF	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	
Mittelwert	8,2	9,4	10,3	10,1	10,6	11,0	
SD	1,55	1,93	1,96	1,90	2,25	1,52	
Ukraine*: Leuprorelin	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	Follow-up
Mittelwert	8,8*	11,4	10,7	11,6	10,1	12,2	10,1
SD	1,90*	2,30	3,51	1,44	2,12	4,23	0,64
Leuprorelin gesamt	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	Follow-up
Mittelwert	8,1*	10,0	10,4	10,4	10,4	11,0	10,1
SD	1,97*	2,16	2,54	2,14	2,20	3,1	0,64

*Eine Patientin mit deutlich erhöhtem s-HER-2/neu-Basiswert wurde aus dieser Analyse herausgenommen. Der Anstieg von s-HER-2/neu für die kleine Ukraine-Gruppe allein betrachtet war wegen der kleinen Fallzahl nicht signifikant.

Parallel zum Anstieg von s-HER-2/neu fiel der Östradiolspiegel sowohl im Leuprorelinarm ($p < 0,0001$) als auch im CMF-Arm ($p = 0,028$) statistisch signifikant ab. Abbildung 22 zeigt diesen Zusammenhang, wobei die mittleren Konzentrationen für alle Parameter unter der x-Achse angegeben sind. Die Boxplots zeigen sowohl die Ranges wie auch die 25-, 50- und 75%-Perzentilen. Dieser Abfall der Serumöstradiolwerte war zwischen den beiden Therapiearmen unterschiedlich ($p = 0,01$), wobei der Abfall im CMF-Arm deutlich geringer ausgeprägt war. Es ist zu beachten, daß sich CA 27.29, über den gesamten Zeitverlauf betrachtet, nicht signifikant veränderte, was darauf hinweist, daß sich s-HER-2/neu aus normalen, epithelialen Zellen der drüsigen Organe rekrutiert und nicht von residuellen Tumorzellen oder einer Rezidivkrankung stammt.

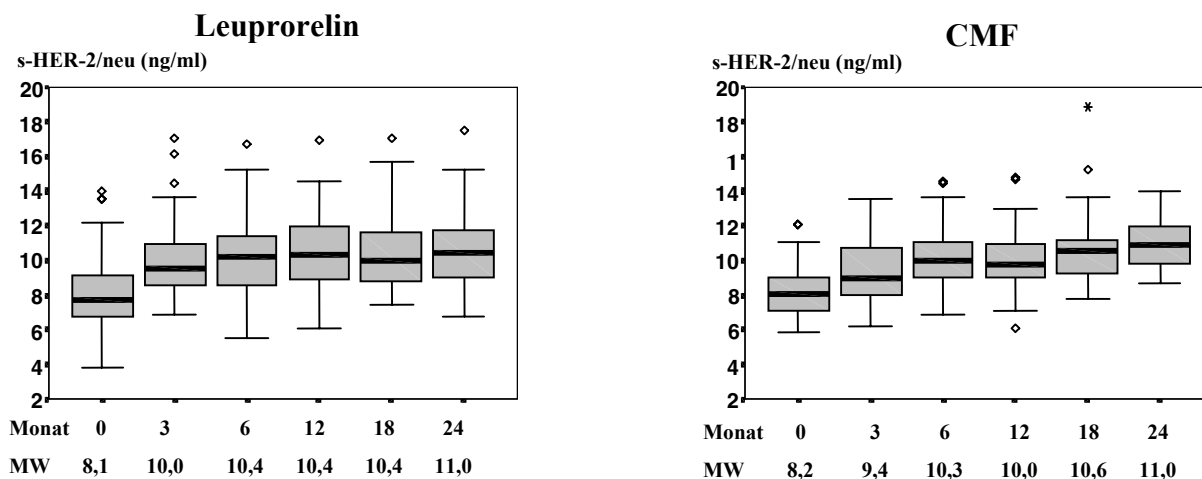
Abbildung 21: Anstieg von s-HER-2/neu während hormoneller Ablation



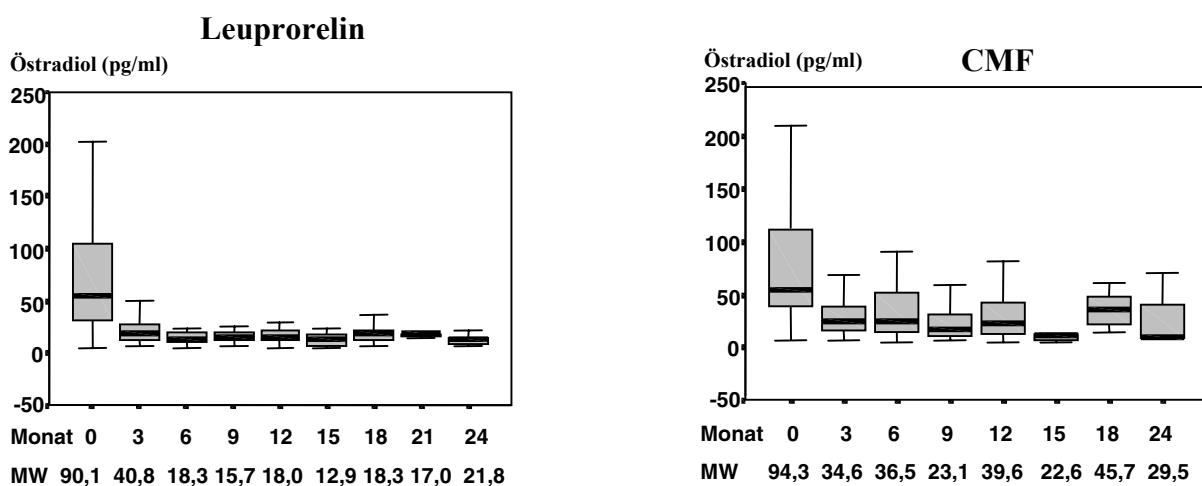
Der größte, relative Anstieg von s-HER-2/neu ereignete sich zwischen baseline und Monat 3 ($p < 0,001$ für beide Arme; siehe Abbildung 22). Dieser ausgeprägte, relative Anstieg verlief parallel zum stärksten absoluten und relativen Abfall der Östradiolspiegel in beiden Behandlungsarmen. Interessanterweise blieb das Östradiolniveau der CMF-Patientinnen nach Beendigung der Chemotherapie als Korrelat der irreversiblen ovariellen Kastration niedrig. Gleichzeitig blieben die s-HER-2/neu-Spiegel über dem Ausgangsniveau erhöht und stiegen bis zum Monat 24 auf 11,0 ng/ml an. Follow-up-Seren über den Monat 24 hinaus standen nur für die Patientinnen im Leuporelin-Arm zum Zeitpunkt Monat 30 zur Verfügung. Diese Seren zeigten einen erneuten Abfall der s-HER-2/neu-Konzentrationen auf 10,1 ng/ml, was wir als Zeichen der reversiblen ovariellen Ablation werten.

Abbildung 22: s-HER-2/neu (A), Östradiol (B, Darstellung ohne Ausreißer) und CA 27.29 (C) von Leuprorelin-Patientinnen im Vergleich zu CMF-Patientinnen. Während der Östradiol-Mittelwert (MW) in beiden Gruppen signifikant abfällt, steigt der s-HER-2/neu-Spiegel statistisch signifikant an ($p < 0,0001$).

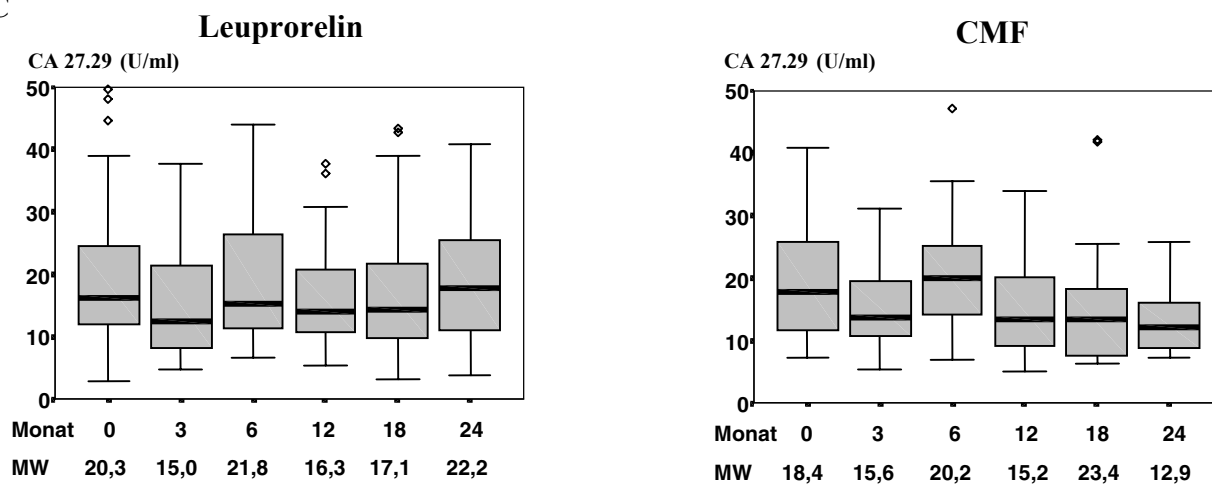
A



B



C



In nur 2,7% (16/587) aller s-HER-2/neu-Bestimmungen lag das Ergebnis höher als der obere Grenzwert von 15 ng/ml, was diesen cut-off für Mammakarzinompatientinnen unabhängig von Behandlungsmodalität und vor allem Menopausenstatus bestätigt. Die im Kapitel 5.1.3. beschriebenen Ergebnisse zur Verteilung der s-HER-2/neu-Konzentrationen bei gesunden prä- und postmenopausalen Frauen hatten das gleiche Resultat erbracht.

Die mittleren baseline-Konzentrationen von Östradiol und LH waren in der Leuprorelin- und der CMF-Gruppe vergleichbar. Von Monat 3 bis Monat 24 verursachte die Leuprorelintherapie einen erheblichen Abfall der Östradiolspiegel (baseline: 90,1 pg/ml; Monat 3: 40,8 pg/ml; Monat 6: 18,3 pg/ml) wie auch der LH-Spiegel (baseline: 9,1 mU/ml; Monat 3: 2,7 mU/ml; Monat 6: 3,3 mU/ml). Die Suppression von Östradiol war insgesamt in der CMF-Gruppe deutlich geringer. Während nach 3 Behandlungsmonaten der Abfall des Serumöstradiolspiegels in beiden Gruppen noch vergleichbar war, war im Monat 6 der CMF-bedingte Östradiolabfall schon geringer als im Leuprorelinarm. Im Gegensatz zum Leuprorelin-Arm stiegen die LH-Konzentrationen in der CMF-Gruppe als Gegenregulation des hypothalamisch-hypophysären Regelkreises an (baseline: 6,8 mU/ml; Monat 3: 21,7 mU/ml; Monat 6: 22,4 mU/ml). Das Ausbleiben der Menstruation war als Zeitraum von mindestens 60 Tagen ohne Monatsblutung definiert. Gemäß dieser Festlegung wurden alle Patientinnen im Leuprorelin-Arm und 45/53 (84,9%) Patientinnen in der CMF-Gruppe postmenopausal.

5.7.2. Konstanz von CA 27.29 während ovarieller Ablation

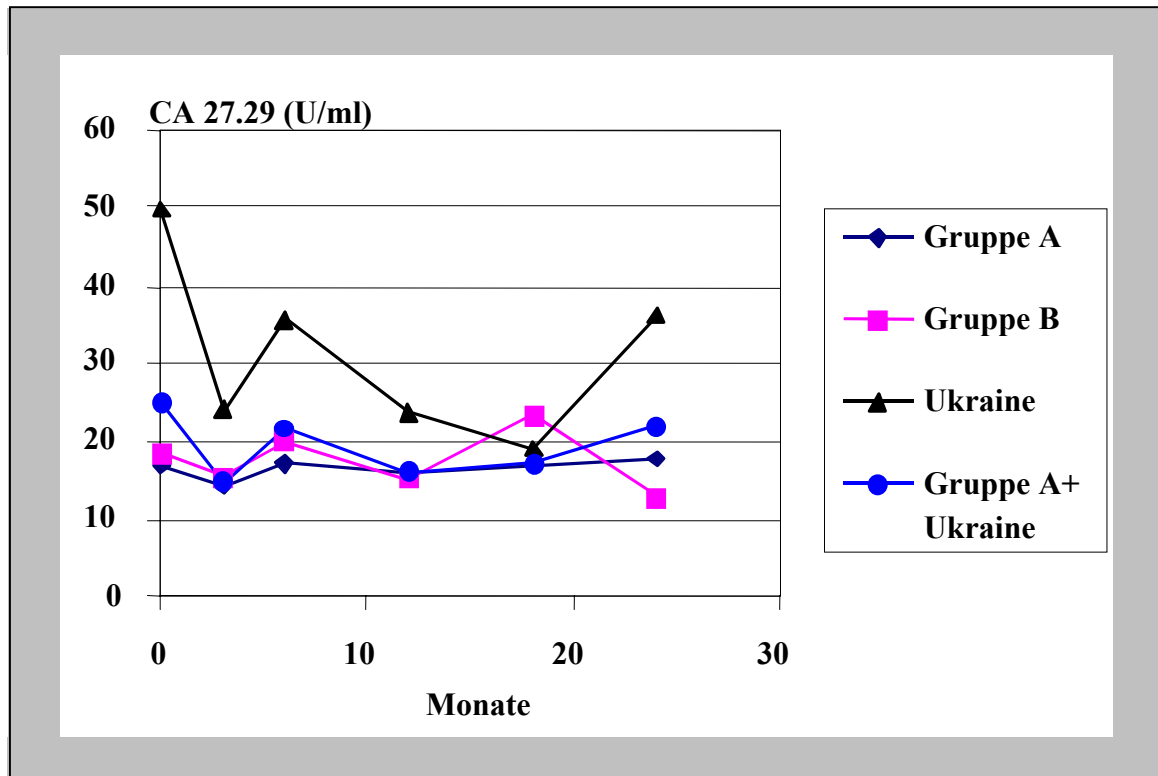
Während die s-HER-2/neu-Spiegel im Zeitverlauf signifikant und anhaltend anstiegen, blieben die mittleren Konzentrationen von CA 27.29 über den Beobachtungsraum von 24 Monaten konstant und fluktuierten unterhalb des oberen cut-off-Wertes von 30 U/ml meistens um einen Wert von 20 U/ml (siehe Tabelle 11 und Abbildung 23).

Tabelle 11: Konstanz von CA 27.29 (U/ml) unter hormoneller Ablation

Gruppe A: Leuprorelin	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	
Mittelwert	16,73	14,05	17,30	15,75	16,67	17,85	
SD	8,14	7,45	8,47	8,24	9,28	9,98	
Gruppe B: CMF	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	
Mittelwert	18,41	15,60	20,25	15,16	23,41	12,92	
SD	8,10	6,91	8,10	7,70	32,44	4,88	
Ukraine: Leuprorelin	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	Follow-up
Mittelwert	49,65	24,19	35,64	23,90	19,16	36,29	19,19
SD	83,78	10,74	57,70	7,47	10,30	41,12	9,56
Leuprorelin gesamt	Baseline	Monat 3	Monat 6	Monat 12	Monat 18	Monat 24	Follow-up
Mittelwert	25,1	14,97	21,8	16,32	17,13	22,18	19,19
SD	44,3	11,46	29,87	8,37	9,42	23,60	9,56

Es ist zu beachten, daß es auch für CA 27.29 im Zeitverlauf statistisch signifikante Veränderungen der Serumkonzentrationen gab (z. B. den oben beschriebenen Abfall von baseline zum Monat 3 in der Leuprorelingesamtgruppe bei einem $p < 0,0001$). Allerdings wird dieser Abfall zwischen Monat 3 und Monat 6 wieder komplett nivelliert, so daß sich über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikante Änderung ergibt.

Abbildung 23: Konstante CA 27.29-Spiegel unter adjuvanter Therapie. Die Patientinnen aus der Ukraine zeigten deutlich erhöhte Eingangswerte und wurden daher separat ausgewertet.

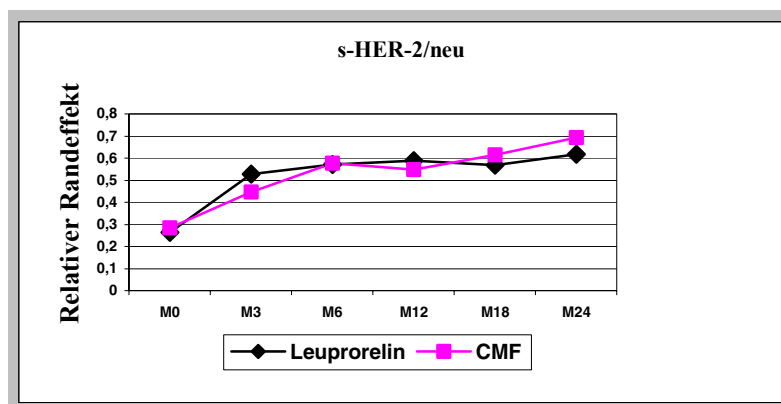


Dieses konstante Niveau von CA 27.29 spricht gegen die ggf. zu stellende Frage, ob sich der ansteigende s-HER-2/neu-Spiegel aus einer zunehmenden Anzahl von noch okkulten, residuellen Tumorzellen ergeben könnte. Auch die bislang sehr geringe Anzahl an Rezidiven von nur n=20 der Patientinnen in diesem biochemischen Begleitprojekt widerspricht einer solchen Hypothese.

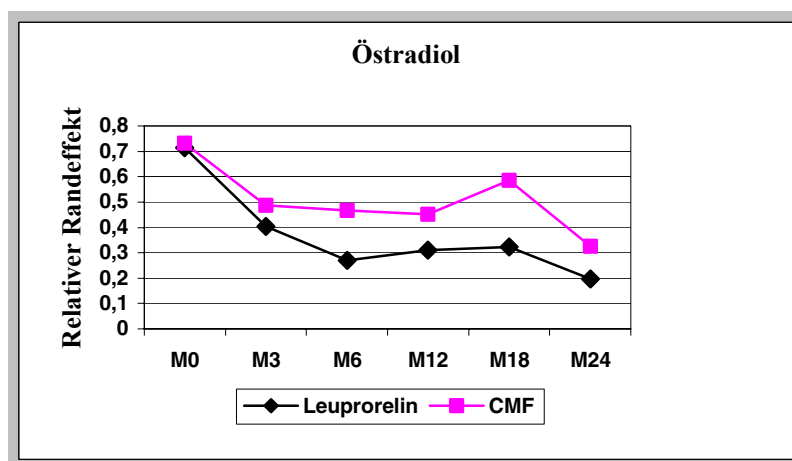
Abbildung 24 zeigt die gemäß der nichtparametrischen Varianzanalyse für Meßwiederholungen nach Brunner berechneten relativen Randeffekte von s-HER-2/neu (A), Östradiol (B) und CA 27.29 (C). Die ausgeprägteste und gegenläufige Veränderung von s-HER-2/neu und Östradiol findet zwischen baseline und Monat 3 statt ($p < 0,001$ für beide Arme und Serumparameter). CA 27.29 zeigte keine signifikanten Veränderungen über den gesamten Zeitverlauf.

Abbildung 24: Relative Randeffekte für s-HER-2/neu (A), Östradiol (B) und CA 27.29 (C) in der nichtparametrischen Varianzanalyse für Meßwiederholungen.

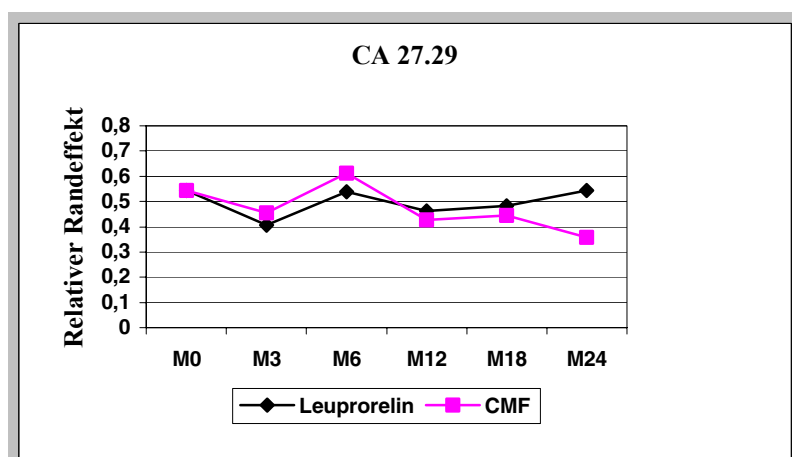
A



B



C



5.7.3. Prognostische Bedeutung von s-HER-2/neu in der adjuvanten Situation

Wie bereits erwähnt, war die Zahl der Rezidive unter den Patientinnen im s-HER-2/neu-Begleitprojekt zum Untersuchungszeitpunkt noch zu gering ($n=20$), um angesichts der Aufteilung in 2 Arme zu einem Ergebnis mit hinreichend großer statistischer power zu führen. Damit muß die Beantwortung der Frage nach der prognostischen und prädiktiven Bedeutung von s-HER-2/neu in der adjuvanten Situation für diese Studie zurückgestellt werden. Da das Gesamtergebnis der Studie unabhängig von der Begleitforschung jedoch von allgemeinem Interesse ist, sei dieses kurz zusammengefasst (58). Das mediane und maximale follow-up lag bei 24 und 31 Monaten in der Leuprorelin-Gruppe und bei 22 und 31 Monaten im CMF-Arm, wobei das mediane progressionsfreie Überleben bislang noch nicht erreicht wurde. Bislang konnte kein Unterschied im rezidivfreien oder Gesamtüberleben zwischen den beiden Behandlungsarmen festgestellt werden. Das mittlere rezidivfreie Überleben lag bei 750 Tagen (95% CI: 694-806) im Leuprorelin-Arm und bei 771 Tagen (95% CI: 717-824) im CMF-Arm ($p=0.94$).

5.8. Prädiktivität und Monitoring durch s-HER-2/neu im Stadium IV

Die prädiktive Bedeutung von s-HER2/neu in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms wurde im Rahmen einer Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel untersucht. Dieses setting erschien besonders interessant, da die Sensitivität von HER-2/neu-überexprimierenden Tumoren gegenüber Paclitaxel kontrovers diskutiert wird (59;60). Die präklinischen und klinischen Ergebnisse zu diesem Thema sind aufgrund unklarer Einflußgrößen wie heterogener Kollektive (lokal fortgeschrittenes Mammakarzinom versus Fernmetastasierung), unterschiedlicher Therapieformen (Patientinnen unter begleitender Strahlentherapie; kombinierte Analysen über die beiden Taxane Paclitaxel und Docetaxel) und insgesamt kleiner Fallzahlen schwer interpretierbar. Ein weiteres bias könnte durch die unterschiedlichen Nachweismethoden für HER-2/neu (IHC, FISH oder Serumtest) entstehen. Allein die Wahl der Nachweismethode kann ein Studienergebnis entscheiden: In der Untersuchung zur Bedeutung von HER-2/neu als

prädiktiven Faktor für die Hochdosischemotherapie des metastasierten Mammakarzinoms durch Harris et al. konnte gezeigt werden, daß das Therapieergebnis nicht vom immunhistochemischen Nachweis von HER-2/neu im Primärtumor abhing, die Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel in der metastasierten Situation aber ein schlechteres outcome hatten (61).

5.8.1. Chemotherapie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel

Ein komplettes Serumset zusammen mit dem klinischen follow-up stand von 35 Patientinnen unter wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel zur Verfügung. Die demographischen Angaben zu diesen 35 Patientinnen sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Mehrzahl der Patientinnen (91%) war beim Studienbeginn postmenopausal. Im allgemeinen hatten die Frauen eine weit fortgeschrittene Erkrankung mit dominanter, viszeraler Beteiligung. Tumorcharakteristika und Vorbehandlung waren bei der s-HER-2/neu-positiven und der s-HER-2/neu-negativen Untergruppe vergleichbar. Der einzige Unterschied in den demographischen Angaben zwischen den s-HER-2/neu-positiven und den s-HER-2/neu-negativen Patientinnen fand sich beim Steroidhormonrezeptorstatus. In der Gruppe der s-HER-2/neu-positiven Patientinnen finden sich vermehrt Frauen mit fehlender Expression sowohl des Östrogen- wie auch des Progesteronrezeptors. Dies entspricht dem bekannten Phänomen, daß HER-2/neu-positive Tumore zumeist steroidhormonrezeptornegativ sind (47;62). Zudem muß erwähnt werden, daß bei fast der Hälfte der Patientinnen der Steroidhormonrezeptorstatus unbekannt war, was den Pathologiestandards für die Tumoraufarbeitung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung dieser Patientinnen entsprach.

Fast alle Patientinnen (97%) waren mit Anthrazyklinen entweder als adjuvante oder als palliative Therapie vorbehandelt. Bei 60% der Patientinnen war Paclitaxel die Zweitlinienchemotherapie für die metastasierte Erkrankung. Insgesamt 34% der Patientinnen standen mit Paclitaxel bereits unter Drittlinienchemotherapie. Zusätzlich

hatten mehr als die Hälfte der Patientinnen auch bereits eine palliative Hormontherapie erhalten.

Tabelle 12: Demographische Angaben der Patientinnen unter wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel

Parameter			Gesamt		HER-2/neu positiv		HER-2/neu negativ	
			n=35	%	n=22	%	n=13	%
Alter bei Ersterkrankung			31-63		34-63		31-56	
			48		49		48	
Alter bei Fernmetastasierung			35-66		35-66		35-62	
			51		51		52	
Alter bei Therapiebeginn mit wöchentlichem Paclitaxel			36-67		36-67		36-65	
			54		53		54	
Operation	modifiziert rad. Mastektomie		24	68%	15	68%	9	9%
	brusterhaltend		10	29%	7	32%	3	23%
	keine		1	3%	0	0%	1	8%
Histologie	invasiv duktal		20	57%	13	59%	7	54%
	inflammatorisch		2	6%	1	5%	1	8%
	andere		13	37%	8	36%	5	38%
Pathologisches staging	T	1-2	25	72%	16	72%	9	70%
		3-4	5	14%	3	14%	2	15%
		x	5	14%	3	14%	2	15%
	N	0	8	23%	5	22%	3	23%
		1-2	20	57%	14	64%	6	46%
		x	7	20%	3	14%	4	31%
	M	0	31	89%	19	86%	12	92%
		1	4	11%	3	14%	1	8%
Grading	G	1	2	6%	2	9%	0	0%
		>1	21	60%	13	59%	8	62%
		x	12	34%	7	32%	5	38%
Rezeptorstatus	ER oder PR positiv		12	34%	8	36%	4	31%
	ER und PR negativ		6	17%	5	23%	1	7%
	unbekannt		17	49%	9	41%	8	62%
Menopausen-status	prämenopausal		3	9%	2	9%	1	8%
	postmenopausal		32	91%	20	91%	12	92%
Metastasen zu Studienbeginn	Anzahl beteiligter Organsysteme	1	9	26%	5	23%	4	31%
		2	11	31%	8	36%	3	23%
		>2	15	43%	9	41%	6	47%
	Dominanz	Viscera	29	83%	19	86%	10	77%
		Weichteile	6	17%	3	14%	3	23%
		Knochen	0	0%	0	0%	0	0%
Chemotherapie	Paclitaxel als 1 st -line		2	6%	0	0%	2	15%
	Paclitaxel als 2 nd -line		21	60%	15	68%	6	46%
	Paclitaxel als 3 rd -line		12	34%	7	32%	5	38%
	adjuvante Chemotherapie		18	51%	13	59%	5	38%
	Anthrazyklin-Vorbehandlung		34	97%	22	100%	12	92%
Hormontherapie	adjuvant		8	23%	3	14%	5	38%
	palliativ		21	60%	11	50%	10	77%
Radiatio	adjuvant		19	54%	12	55%	7	54%
	palliativ		15	43%	11	50%	4	31%

Wir korrelierten s-HER-2/neu mit dem Behandlungserfolg und untersuchten die Möglichkeit des Monitorings. Die baseline-s-HER-2/neu-Spiegel reichten von 5-2373 ng/ml (Mittelwert: 142 ng/ml; Median 18 ng/ml). 22 Patientinnen (62,9%) zeigten einen erhöhten baseline-s-HER-2/neu-Spiegel ≥ 15 ng/ml. Insgesamt 14/35 Frauen (40%) boten eine objektive Remission (siehe Tabelle 13). Unter Berücksichtigung eines Anteils von 34,3% an Patientinnen mit stabiler Erkrankung muß fraktioniertes, dosisintensiviertes Paclitaxel angesichts des mehrfach vorbehandelten Patientinnenguts damit als sehr effektive Therapie angesehen werden. Die Ansprechrate zwischen den s-HER-2/neu-positiven- und den s-HER-2/neu-negativen Patientinnen zeigte keinen Unterschied ($p=0,4$).

Tabelle 13: Überblicksdarstellung des Bezugs von s-HER-2/neu mit dem Therapieansprechen (CD, PR, SD versus PD), dem progressionsfreien Überleben und der Dauer der response

Best response (n=35)				
s-HER-2/neu	Anzahl an Patienten	Ergebnis	Anzahl an Patienten	%
Gesamt	35	CR oder PR oder SD: CR oder PR: PD:	26 14 9	74,3% 40,0% 25,7%
Positiv	22	{ CR oder PR oder SD: CR oder PR: PD:	17* 9 5*	77,3% 40,9% 22,7%
Negativ	13	{ CR oder PR oder SD: CR oder PR: PD:	9* 5 4*	69,2% 38,5% 30,8%
<i>*p=0,4</i>				
Progressionsfreies Überleben (n=26)			Dauer der response (n=14)	
s-HER-2/neu	Anzahl an Patienten	Progressionsfreies Überleben (Wochen)	Anzahl an Patienten	Dauer der response (Wochen)
Gesamt	26	38,8	14	39,8
Positiv	17	31,2**	9	25,7***
Negativ	9	53,1**	5	65,2***
<i>**p=0,098</i>			<i>***p=0,042</i>	

Es bestand ein Trend zugunsten eines besseren progressionsfreien Überlebens für die s-HER-2/neu-negativen Patientinnen (im Mittel 53,1 Wochen) im Vergleich zu den s-HER-2/neu-positiven Patientinnen (im Mittel 31,2 Wochen; $p=0,098$). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Korrelation des baseline-s-HER-2/neu-Spiegels mit der Responsedauer erbrachte einen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,042$) zugunsten der s-HER-2/neu-negativen Patientinnen, für welche die Responsedauer mit 65,2 Wochen mehr als zweieinhalbfach länger war als für die s-HER-2/neu-positive Subgruppe mit 25,7 Wochen (siehe Abbildung 26).

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve über das progressionsfreie Überleben für alle Patientinnen unabhängig vom s-HER-2/neu-Spiegel ($n=35$) und für die s-HER-2/neu-positive Untergruppe ($n=22$) im Vergleich zu den Patientinnen mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel ($n=13$)

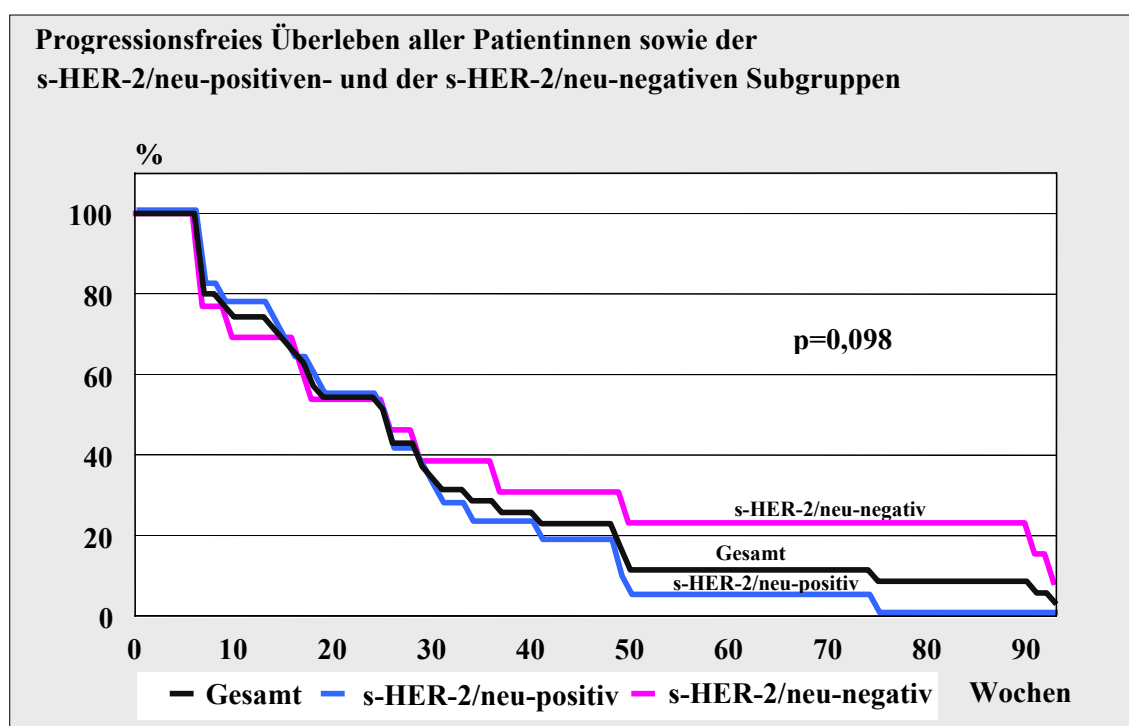
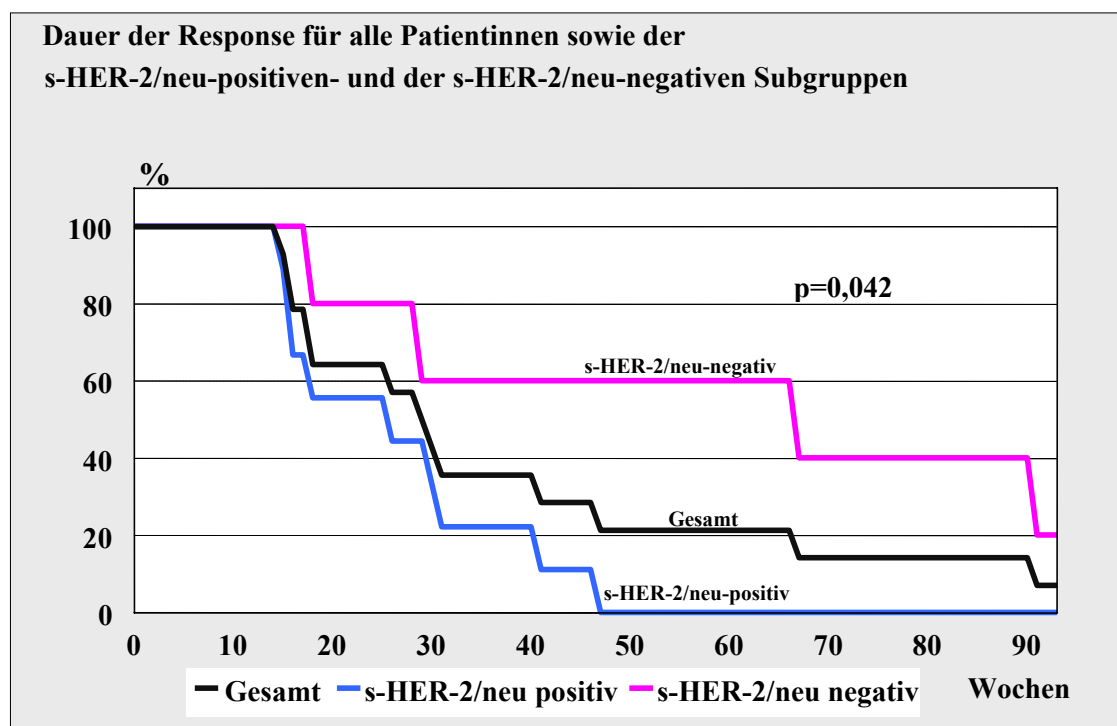


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Dauer der response für alle Patientinnen unabhängig vom s-HER-2/neu-Spiegel (n=14) und für die s-HER-2/neu-positive Untergruppe (n=9) im Vergleich zu den Patientinnen mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel (n=5)



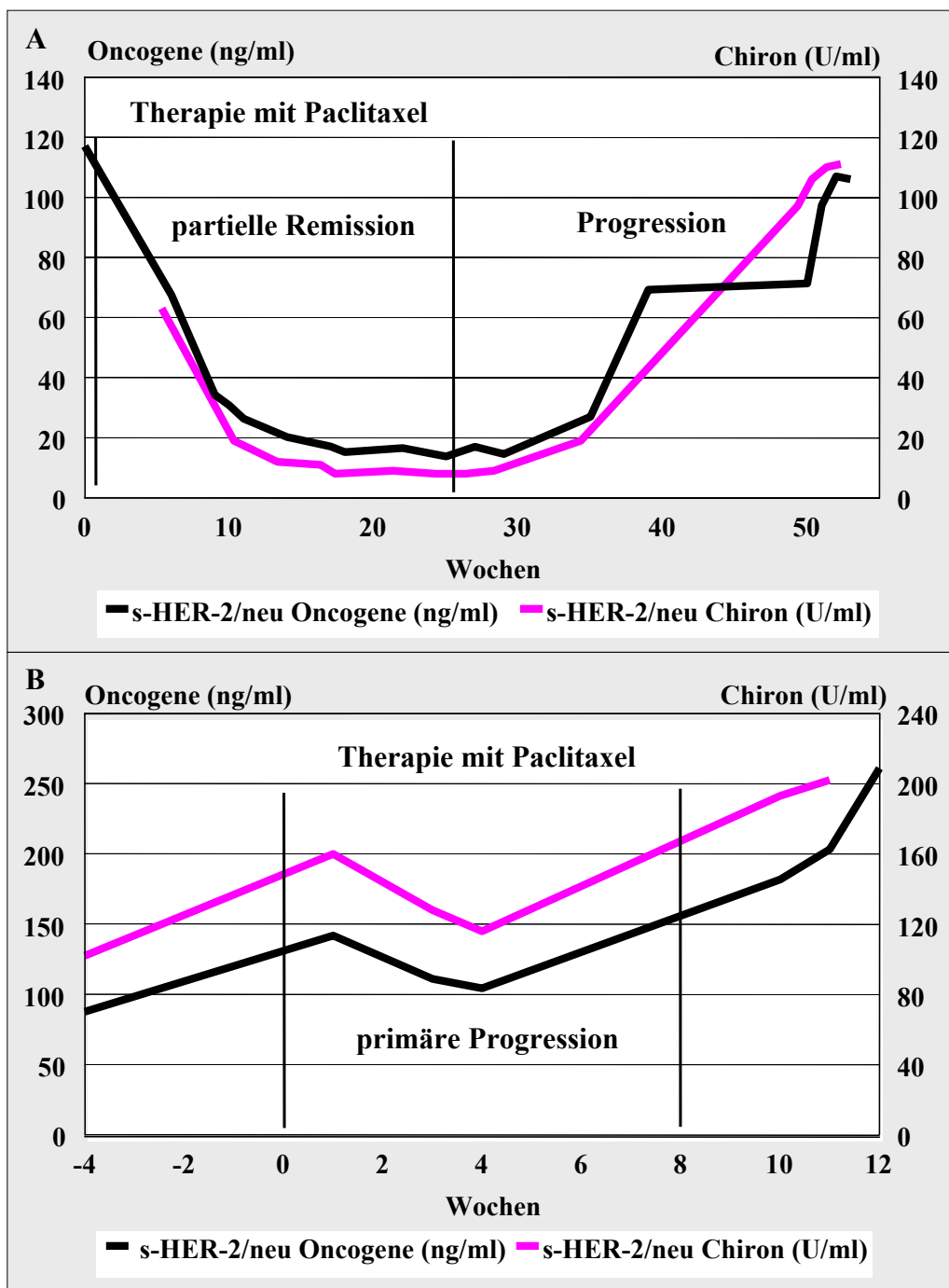
Als nächsten Schritt untersuchten wir rein rechnerisch, ob es innerhalb der s-HER-2/neu-positiven Patientinnen noch biologische Untergruppen gibt. Wir testeten die Patientinnen mit s-HER-2/neu-Konzentrationen ≥ 20 ng/ml, ≥ 22 ng/ml, ≥ 25 ng/ml und ≥ 30 ng/ml jeweils im Vergleich zu jenen mit s-HER-2/neu-Konzentrationen < 20 ng/ml, < 22 ng/ml, < 25 ng/ml und < 30 ng/ml. Dabei fanden wir ein statistisch signifikant kürzeres ($p=0,022$) progressionsfreies Überleben jenseits einer Grenze von 22 ng/ml mit einem von da an fallenden p-Wert (siehe Tabelle 14). Somit konnten wir einen quantitativen, umgekehrten Bezug zwischen dem Therapieergebnis und dem s-HER2/neu-Spiegel darstellen. Die s-HER-2/neu-positive Patientinnengruppe ist in sich heterogen und lässt sich mit Hilfe des rein metrischen s-HER-2/neu-Spiegels in biologische Untergruppen einteilen.

Tabelle 14: Verschlechterung des progressionsfreien Überlebens bei Wahl eines höheren s-HER-2/neu-cut-offs >15 ng/ml im Sinne eines Hinweises auf biologische Subgruppen der s-HER-2/neu-Positivität

Variation des cut-off-Wertes von s-HER-2/neu (ng/ml)	s-HER-2/neu-Status	Anzahl an Patienten	Progressionsfreies Überleben (Wochen)	p
	gesamt:	26	38,8	
15	positiv: negativ:	17 9	31,2 53,1	0,098
20	positiv: negativ:	12 14	21,1 72,1	0,065
22	positiv: negativ:	11 15	16,8 80,3	0,022
25	positiv: negativ:	10 16	13,9 85,7	0,0089
30	positiv: negativ:	9 17	11,6 90,1	0,0039

Zur Beurteilung der Möglichkeit des Monitorings mit s-HER-2/neu korrelierten wir schließlich den klinischen Therapieerfolg mit dem longitudinalen Verlauf der s-HER-2/neu-Spiegel. In Abbildung 27A und B ist der Verlauf der s-HER-2/neu-Konzentrationen von 2 Patientinnen, gemessen mit dem Oncogene-Assay und dem Chiron-Assay, dargestellt. Abbildung 27A zeigt die s-HER-2/neu-Kurve einer Patientin, die im Therapieverlauf eine partielle Remission entwickelte. Während der Behandlung fiel ihr s-HER-2/neu-Spiegel unter den oberen Grenzwert von 15 ng/ml ab. Zum Zeitpunkt der erneuten Progression stieg s-HER-2/neu erneut an. In Abbildung 27B sind dagegen die Veränderungen von s-HER-2/neu bei einer Patientin mit primärem Therapieversagen unter wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel dargestellt. Ihre s-HER-2/neu-Spiegel stiegen im gesamten Behandlungsverlauf bis auf eine einmalige biologische Schwankung an. Die Messungen mit beiden ELISA-Assays brachten vergleichbare Ergebnisse, ähnlich wie auch in der linearen Regression unter Punkt 5.2. dargestellt.

Abbildung 27: Kasuistiken zum longitudinalen Verlauf von s-HER-2/neu. A: Patientin mit partieller Remission und späterer Progression. B: Patientin mit primärer Progression.



In der Gesamtanalyse zum Monitoring durch s-HER-2/neu bestimmten wir die mittlere Veränderung der s-HER-2/neu-Konzentration für Patientinnen mit partieller oder kompletter Remission im Vergleich zu Patientinnen mit stabiler Erkrankung und im

Vergleich zu Patientinnen mit primärer Progression. In der s-HER-2/neu-positiven Subgruppe lag der mittlere Abfall der s-HER-2/neu-Spiegel bei 19,6 ng/ml für Patientinnen mit objektivem Ansprechen, während der s-HER-2/neu-Spiegel um 17,3 ng/ml bei Patientinnen mit primärer Progression anstieg (siehe Tabelle 15). Dieser unterschiedliche Verlauf zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p=0,15$), was auch im Hinblick auf die moderate Gruppengröße gewertet werden muß. Interessanterweise stieg der s-HER-2/neu-Spiegel bei Patientinnen mit stabiler Erkrankung im Mittel um mehr als 200 ng/ml an. Dies ist am ehesten als früher, biochemischer Hinweis auf die Progression der Erkrankung zu werten, während die morphologisch sichtbare Progression gemäß den Restaginguntersuchungen diesem Phänomen hinterherhinkt.

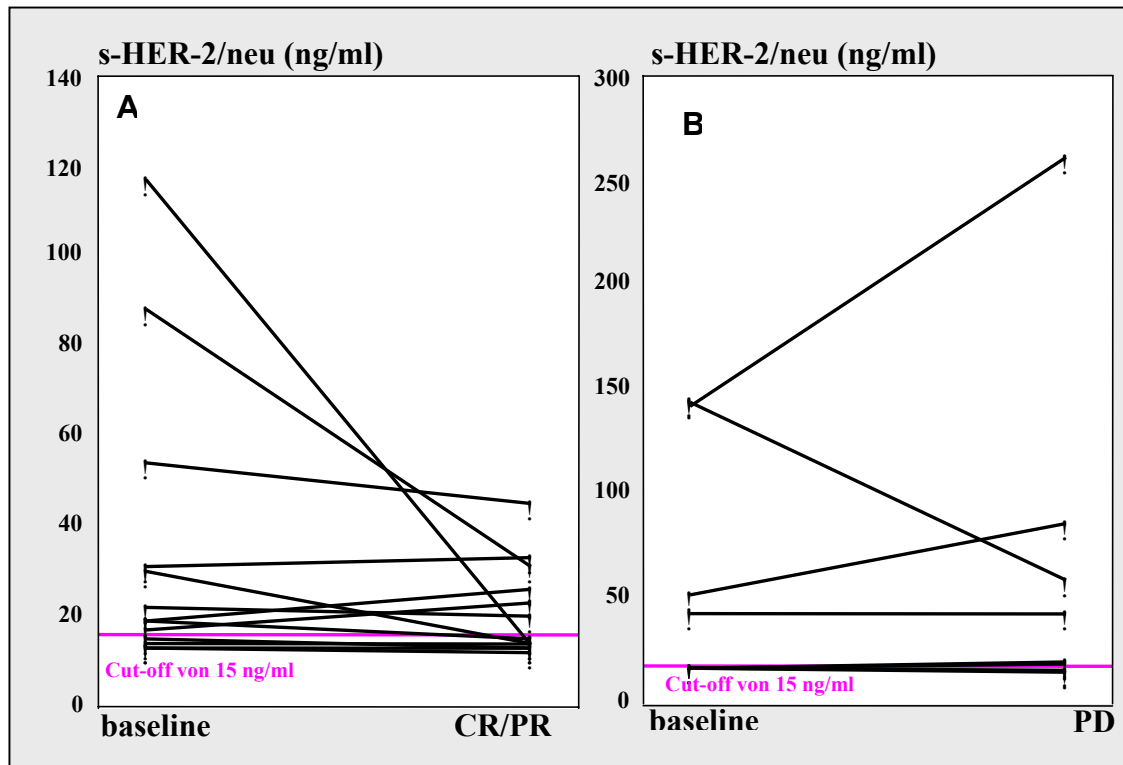
Tabelle 15: Veränderung des s-HER-2/neu-Spiegels unter Therapie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel (Referenzzeitpunkte: baseline und Zeitpunkt der best response-Evaluierung)

Longitudinaler Verlauf des s-HER-2/neu-Spiegels (n=33)				
	Anzahl an Patienten		Mittlere Veränderung der s-HER-2/neu-Konzentration	
	s-HER-2/neu-positiv	s-HER-2/neu-negativ	s-HER-2/neu-positiv	s-HER-2/neu-negativ
CR+PR	9	4	-19,6	-0,8
SD	8	3	+213,5	+1,0
PD - reduziert*	4	4	+17,0	+0,5

*Eine Patientin wurde wegen eines extrem hohen s-HER-2/neu-Spiegels nicht berücksichtigt.

Zudem konnte bei 66,6% aller Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-Baselinespiegel und objektiver Remission ein Abfall von s-HER-2/neu unter den oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml nachgewiesen werden (siehe Abbildung 28A). Bei Patientinnen mit primärer Progression konnte, wenn auch nur sehr selten, ein vergleichbarer Abfall demonstriert werden (siehe Abbildung 28B). Dieser Umstand und die niedrige Fallzahl sind am ehesten dafür verantwortlich, daß sich insgesamt zum Monitoring keine statistische Signifikanz ergab. s-HER-2/neu-negative Patientinnen zeigten unter Therapie keine relevanten Veränderungen der s-HER-2/neu-Konzentration.

Abbildung 28: Graphische Darstellung der s-HER-2/neu-Verläufe. A: Patientinnen mit Remission auf wöchentliches Paclitaxel. B: Patientinnen mit primärer Progression.



(Eine Patientin wurde wegen ihres extrem hohen s-HER-2/neu-baseline-Wertes mit >2000 ng/ml aus der graphischen Darstellung herausgenommen.)

Von 19 Patientinnen waren zusätzlich zu den Serumergebnissen unter wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel auch s-HER-2/neu-Resultate aus früheren Chemotherapien vorhanden. Im Median waren diese Serumproben 31 Wochen vor Einleitung der Therapie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel abgenommen worden, d.h. zu einer Zeit mit sicherlich deutlich niedrigerer Tumorlast. Während der mittlere s-HER-2/neu-Spiegel dieser Patientinnen zum Zeitpunkt dieser früheren Chemotherapie bei 22,2 ng/ml lag, stieg die mittlere Konzentration um das ca. Zehnfache bis zum Zeitpunkt der Therapieeinleitung mit fraktioniertem Paclitaxel an.

5.8.2. Multivariate Analyse unterschiedlicher Serumparameter unter Mehrlinien-Chemotherapie

Die Zahl an Patientinnen zur Untersuchung der Bedeutung von s-HER-2/neu aus der Phase II-Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel war für eine multivariate Analyse nicht ausreichend und enthielt zudem ein selektioniertes Patientinnengut. Wir erweiterten daher unser Untersuchungskollektiv auf 111 sequentielle Chemotherapiepatientinnen aus der Mamma-Ambulanz der Medizinischen Klinik II, welche ihr Einverständnis für longitudinale Blutentnahmen zur Analyse von prognostischen und prädiktiven Faktoren beim Mammakarzinom gegeben hatten. Für diese Blutentnahmen lag von der Ethikkommission der Charité am Campus Mitte ein positives Votum vor. Zudem entschlossen wir uns, die differentielle Wertigkeit anderer Serumfaktoren im Vergleich zu s-HER-2/neu zu untersuchen. Wir wählten s-EGFR als weiteres Mitglied der EGF-Rezeptorfamilie, uPA als Indikator für die Zerstörung der Interzellulärsubstanz sowie CA 27.29 als konventionellen Tumormarker.

Tabelle 16 faßt die demographischen Angaben dieser 111 Patientinnen zusammen. Etwa 70% der Frauen hatten sich wegen eines invasiv duktales, ER-positiven, nodalpositiven T1-2-Tumors einer modifiziert radikalen Mastektomie unterziehen müssen. Die Mehrzahl der Patientinnen hatte im Erkrankungsverlauf ein Lokalrezidiv durchgemacht. Rund die Hälfte der Patientinnen hatte eine adjuvante Chemotherapie gehabt, während ein Drittel eine adjuvante Hormontherapie erhalten hatte. Auch für die metastasierte Erkrankung hatten bereits ca. 50% der Frauen vor Einleitung der in dieser Analyse untersuchten Chemotherapie eine Hormonbehandlung durchgeführt. Die Patientinnen waren in den Gruppen mit Erst-, Zweit- sowie Dritt- und Mehrlinienchemotherapie gleichmäßig zu je einem Drittel verteilt. Die Chemotherapieregimes basierten in der überwiegenden Mehrzahl entweder auf Taxanen oder Anthrazyklinen oder der Kombination von Substanzen aus beiden Zytostatikagruppen (siehe Tabelle 17), selten genutzte Kombinationen werden nicht separat aufgeführt.

Tabelle 16: Demographische Angaben zu den Patientinnen unter Mehrlinienchemotherapie

Parameter		Gesamt (%)	
Operation	modifiziert radikale Mastektomie	72	
	brusterhaltend	25	
Lokalrezidiv	Ja	69	
Histologie	invasiv duktal	72	
	inflammatorisch	3	
	lobulär	6	
	andere	19	
Pathologisches staging	T	1	32
		2	38
		3	12
		4	18
	N	0	26
		1	65
		2	8
		3	1
	M	0	84
		1	16
Grading	G	1	56
		2	45
		3	49
Rezeptorstatus	ER positiv	72	
	PR positiv	55	
HER-2/neu-Status (FISH oder DAKO)	positiv	33	
Menopausenstatus	prämenopausal	88	
	postmenopausal	12	
Metastasen zu Studienbeginn	Anzahl	1	30
	beteiligter	2	36
	Organsysteme	>2	34
	Dominanz	Viszera	79
		Weichteile	16
Knochen		5	
Adjuvante Chemotherapie	Ja	47	
Hormontherapie	adjuvant	29	
	palliativ	55	
Radiatio	adjuvant	50	
	palliativ	36	

Tabelle 17: Art, Linie und Erfolg der Chemotherapie im Beobachtungszeitraum

Chemotherapie	Gesamt (%)	Chemotherapie-Linie (%)			
		1	2	3	4
Taxane	50,5	10,9	54,6	32,7	1,8
Anthrazykline	6,3	71,4	28,6	0	0
Gemcitabine	17,1	52,6	26,3	15,8	5,3
Anthracykline + Taxane	9,0	70,0	10,0	10,0	10,0
Anthrazykline + Gemcitabine	4,5	60,0	40,0	0	0
Chemotherapie	Gesamt (%)	Best response (%)			
		CR	PR	SD	PD
Taxane	50,5	4,5	31,1	31,1	33,3
Anthrazykline	6,3	0	42,9	42,9	14,3
Gemcitabine	17,1	0	22,2	38,9	38,9
Anthrazykline + Taxane	9,0	40,0	10,0	10,0	40,0
Anthrazykline + Gemcitabine	4,5	0	25,0	50,0	25,0
Chemotherapie-Linie	Gesamt (%)	Best response (%)			
		CR	PR	SD	PD
Erstlinientherapie	35,5	16,2	21,6	29,7	32,5
Zweilinietherapie	38,2	2,7	29,7	35,1	32,5
Drittlinientherapie	21,8	5,0	30,0	25,0	40,0
Viertlinientherapie	3,6	0	0	66,7	33,3

Für die multivariate Analyse wählten wir aus einer seriellen Probensammlung im Abstand von 2-3 Wochen als repräsentative Seren die Proben zu den Zeitpunkten baseline und best response aus.

Die s-HER-2/neu-Spiegel reichten von 5-2373,1 ng/ml (baseline-Median und -Mittelwert: 17,4 ng/ml und 87 ng/ml; siehe Tabelle 18). Der HER-2/neu-Status im Gewebe war von 30/111 Patientinnen sowohl mittels IHC (DAKO) wie auch mittels FISH bekannt. Von diesen 30 bekannten Ergebnissen waren 10 HER-2/neu-gewebepositiv. Die s-EGFR-Konzentrationen reichten von 32-135 ng/ml mit einem baseline-Median von 56,4 ng/ml und einem Mittelwert von 57,4 ng/ml. Während also bei s-EGFR der Mittelwert und der Median übereinstimmen (entsprechend der gleichmäßigen Verteilung der EGFR-Expression beim Mammakarzinom im allgemeinen) und keine Korrelation zur Tumormasse besteht, sind für s-HER-2/neu der Median und Mittelwert sehr unterschiedlich (siehe nächste Seite). Dies spiegelt die HER-2/neu-Überexpression bei nur einem Drittel aller Mammakarzinompatientinnen sowie die Korrelation zur Tumorlast wieder. Die s-uPA-Konzentrationen reichten von 524-5086 pg/ml (Median: 1433,2 pg/ml, Mittelwert 1606,2 pg/ml). Wie schon bei s-HER-2/neu waren auch bei CA 27.29 der Median (103 U/ml) und der Mittelwert (484 U/ml) unterschiedlich, was auf die unterschiedliche Tumorlast in dieser heterogenen Population hinweist.

Tabelle 18: Überblick über die biochemischen Serumergebnisse (der Range bezieht sich auf alle gemessenen Proben, im übrigen werden Mittelwert, Median und Perzentilen der baseline-Probe angegeben)

Biochemischer Parameter	Range von - bis		Mittelwert baseline	Perzentilen		
				25	50/Median	75
s-HER-2/neu (ng/ml)	4,97	2373,1	87,0	12,5	17,4	40,0
s-EGFR (ng/ml)	30,0	136,2	57,7	49,2	57,1	65,4
s-uPA (pg/ml)	524,0	5086,0	1606,2	1236,6	1433,2	1735,0
CA 27.29 (U/ml)	7,8	12612,8	484,5	34,6	103,2	360,8

Für CA 27.29 konnte der Bezug zur Tumormasse als statistisch hochsignifikant dargestellt werden. Die Beziehungen der baseline-Spiegel der verschiedenen Serumparameter zu der Anzahl betroffener Organe sowie zur dominanten Lokalisation der Metastasen ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Mittlere baseline-Spiegel der biochemischen Marker und ihre Assoziation zu Tumorlast und Tumorlokalisation

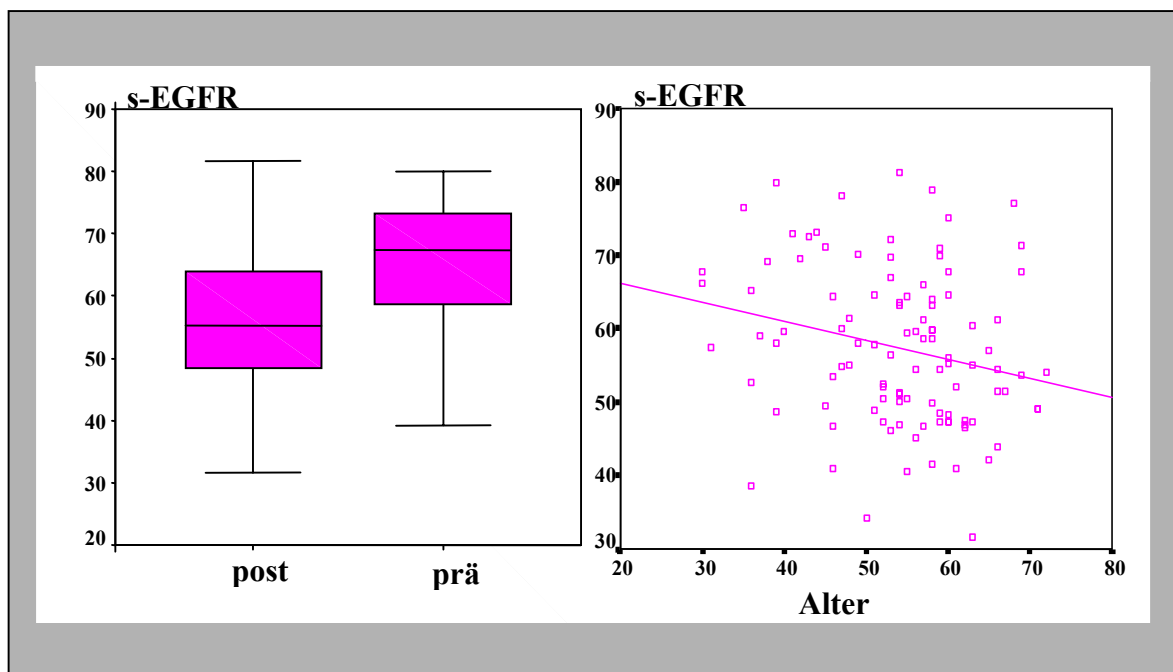
Tumorlast	Anzahl beteiligter Organe			
	1	2	3	p-Wert
s-HER-2/neu (ng/ml)	48,9	111,1	139,9	ns
s-EGFR (ng/ml)	58,8	57,6	56,8	ns
s-uPA (pg/ml)	1559,5	1769,8	1484,9	ns
CA 27.29 (U/ml)	102,3	371,5	1201,5	<0,001
Tumorlokalisation	Dominanz der Erkrankung			
	Viszera	Weichteile	Knochen	p-Wert
s-HER-2/neu (ng/ml)	107,2	15,5	16,6	0,010
s-EGFR (ng/ml)	57,6	56,9	61,7	ns
s-uPA (pg/ml)	1672,0	1320,8	1548,8	ns
CA 27.29 (U/ml)	596	79,4	114,8	0,009

ns = nicht signifikant

Die Angaben zu s-HER-2/neu und der Tumorlokalisation spiegeln die high risk-Konstellation der HER-2/neu-Positivität wieder. Niedrigrisikomanifestationen wie Weichteil- oder Knochenmetastasen gehen mit einem nahezu normalen s-HER-2/neu-Spiegel einher, während bei vorwiegend viszeralem Befall der mittlere s-HER-2/neu-Spiegel auf ein Vielfaches der oberen Norm erhöht ist.

Für s-EGFR stellten wir eine geringfügige Korrelation zum Alter der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom fest, zum anderen zur HER-2/neu-Amplifikation im Gewebe. Abbildung 29 zeigt den Bezug von s-EGFR zum Menopausenstatus ($p=0,009$) und zum Alter ($p=0,014$; Korrelationskoeffizient $-0,239$). Der mittlere s-EGFR-Spiegel für postmenopausale Frauen lag bei 56,5 ng/ml, während prämenopausale Mammakarzinompatientinnen eine mittlere s-EGFR-Konzentration von 64,7 ng/ml aufwiesen.

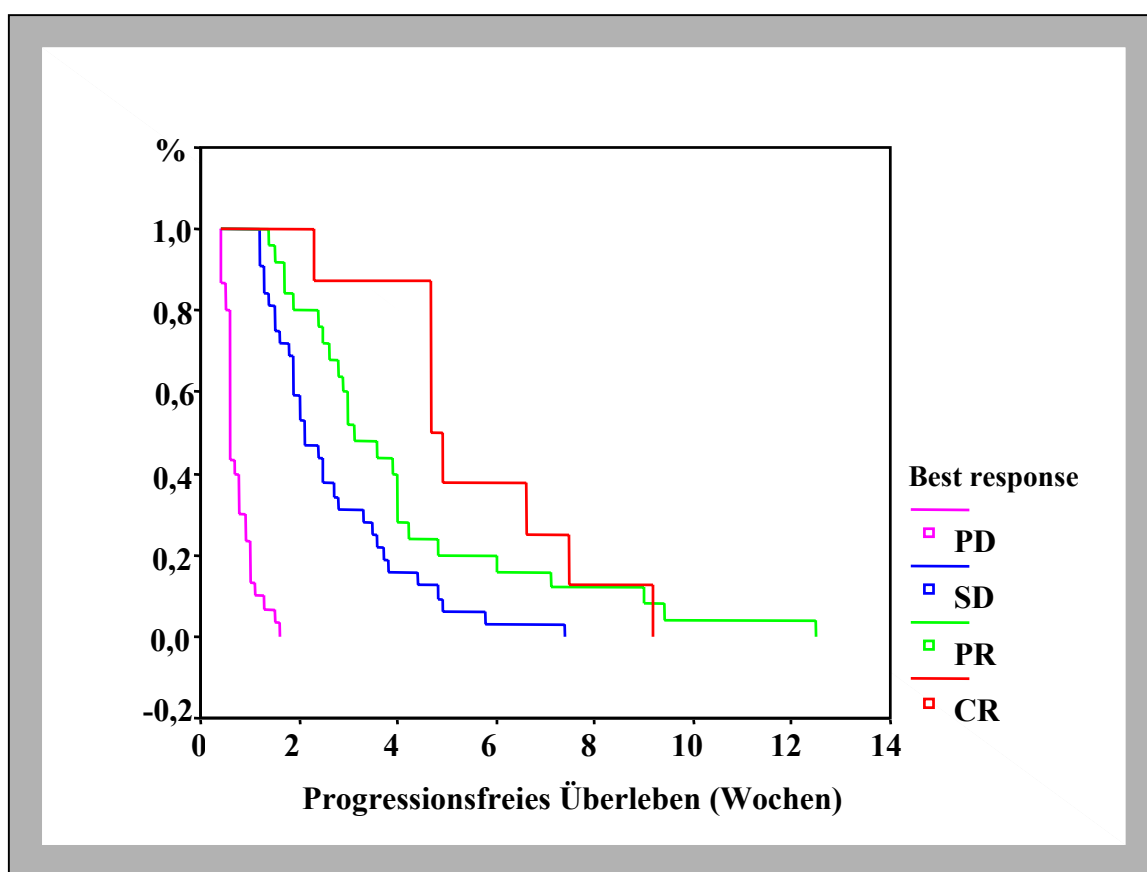
Abbildung 29: s-EGFR und seine schwache Korrelation zum Menopausenstatus ($p=0,009$) und zum Alter im allgemeinen ($p=0,014$)



HER-2/neu-negative Patientinnen im FISH-Test boten einen mittleren s-EGFR-Spiegel von 57,7 ng/ml, während die FISH-positiven Patientinnen im Mittel eine s-EGFR-Konzentration von 51,2 ng/ml zeigten ($p=0,063$). Stellte man nicht die Frage nach einer rein metrischen Verteilung, sondern untersuchte die Gruppenbildung von Patientinnen mit s-EGFR-Spiegeln ≤ 50 ng/ml versus >50 ng/ml, fand man eine statistisch signifikante Häufung der Patientinnen mit niedrigem s-EGFR-Spiegel in der Gruppe der FISH-positiven Patientinnen ($p=0,044$).

Das Ergebnis der palliativen Chemotherapie war wie folgt: CR 8,2%, PR 25,5%, SD 32,7%, PD 33,7% (Aufteilung in Linie und Art der Chemotherapie siehe Tabelle 17). Die mittlere Zeit bis zur Progression in Relation zum Remissionsstatus lag bei 55,8 Wochen für Patientinnen mit CR, bei 41,2 Wochen für Patientinnen mit PR sowie bei 26,9 Wochen für Patientinnen mit SD (siehe Abbildung 30). Diese Unterschiede in der Zeit bis zur Progression waren statistisch signifikant ($p \leq 0,001$). Die gute Auftrennung der progressionsfreien Intervalle zwischen den Remissionsgruppen beweist ex post die korrektive Gruppenbildung für unsere biochemischen Analysen.

Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Intervall in Abhängigkeit vom Remissionsstatus



In der univariaten Analyse hing das objektive Ansprechen auf die Chemotherapie nicht von den folgenden Faktoren ab: Alter bei Erstdiagnose oder Fernmetastasierung; Art der Primäroperation (Mastektomie oder brusterhaltende Operation); Auftreten eines

Lokalrezidivs; Tumorstadium, Grading, Histologie, Steroidhormonrezeptorstatus; Status von HER-2/neu im Gewebe; adjuvante Behandlung (Chemotherapie, Hormonbehandlung, Radiatio); Dominanz der Erkrankung (Viszera, Weichteile, Knochen); Art und Linie der Chemotherapie; vorangegangene Hormontherapie für die metastasierte Erkrankung; response auf die Erstlinienchemotherapie; baseline-Serumspiegel von HER-2/neu, EGFR oder uPA. Tabelle 20 faßt die statistisch signifikanten Ergebnisse der univariaten Analyse zur Assoziation von Ansprechen und progressionsfreiem Intervall zu verschiedenen klinischen und biologischen Parametern zusammen.

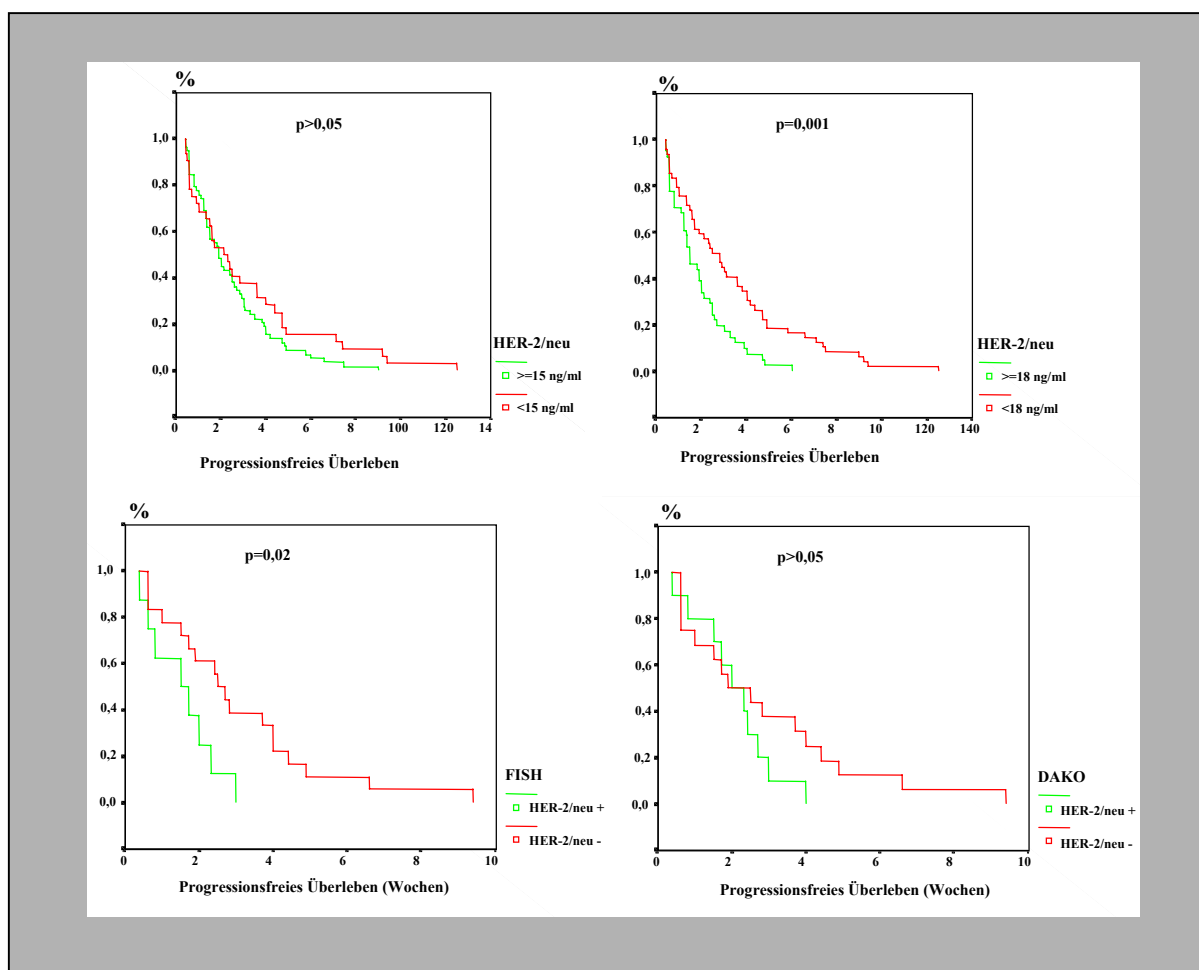
Tabelle 20: Ergebnisse der univariaten Analyse zu Ansprechen und progressionsfreiem Intervall. Angegeben werden nur die Parameter, die auf mindestens einen der Endpunkte einen statistisch signifikanten Einfluß erbrachten.

		Best response	Progressionsfreies Überleben
Parameter		χ^2 Test (Fisher's exact) p-Wert	Kaplan-Meier (Log-Rank) p-Wert
Remissionsstatus		---	p<0,0001
HER-2/neu-Gewebestatus (FISH)		ns	0,021
Menopausenstatus		0,005	ns
Vorangegangene adjuvante Chx		ns	0,029
Lokalrezidiv		ns	0,065
Best response auf Erstlinien-Chx		ns	ns
Best response auf Zweitlinien-Chx		0,015	0,003
Palliative Radiatio		0,031	ns
Anzahl beteiligter Organe (1, >1)		0,020	0,002
s-EGFR	Cut-off 50 ng/ml	ns	ns
s-uPA	Cut-off 1800 pg/ml	ns	ns
CA 27.29	Cut-off 30 U/ml	0,014	ns
s-HER-2/neu	Cut-off 15 ng/ml	ns	ns
	Cut-off 18 ng/ml	ns	0,001
	Cut-off 20 ng/ml	ns	0,004

ns = nicht signifikant; Chx = Chemotherapie

Der Nachweis der HER-2/neu-Überamplifikation durch FISH ($p=0,021$) und ein s-HER-2/neu-baseline-Spiegel ≥ 17 ng/ml, aber nicht die immunhistochemische HER-2/neu-Expression im Gewebe ($p=0,2178$), korrelierten statistisch signifikant mit dem progressionsfreien Intervall. Die statistische Signifikanz für die prädiktive Bedeutung von s-HER-2/neu stieg mit einem p-Wert von $p=0,1561$ für den oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml über einen p-Wert von $p=0,0845$ für den Grenzwert von 16 ng/ml auf den ersten signifikanten p-Wert von $p=0,021$ bei 17 ng/ml und schließlich sogar von $p=0,0011$ bei 18 ng/ml an. Patientinnen mit einem s-HER-2/neu-Spiegel <18 ng/ml hatten ein mittleres progressionsfreies Intervall von 34 Wochen, während die Subgruppe mit einem s-HER-2/neu-Spiegel ≥ 18 ng/ml ein mittleres progressionsfreies Überleben von nur 19 Wochen aufwies. Die Kaplan-Meier-Kurven für s-EGFR (≤ 50 ng/ml versus >50 ng/ml), s-uPA (<1800 pg/ml versus ≥ 1800 pg/ml) sowie CA 27.29 (<30 U/ml versus ≥ 30 U/ml) erbrachten keinen Einfluß auf das progressionsfreie Überleben.

Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Intervall in Relation zum HER-2/neu-Ergebnis mit unterschiedlichen Nachweismethoden



In die multivariate Cox-Regression gingen alle Parameter ein, die in der univariaten Analyse einen p-Wert $\leq 0,1$ erbracht hatten, und die bei einer ausreichenden Anzahl an Patientinnen bekannt waren. Dies galt für folgende Parameter: Remissionsstatus (CR+PR, SD, PD), adjuvante Chemotherapie (ja/nein), Anzahl beteiligter Organe (1 versus ≥ 2), Lokalrezidiv (ja/nein) und den s-HER-2/neu-Spiegel (<18 versus ≥ 18 ng/ml). Die Cox-Analyse identifizierte die in Tabelle 21 dargestellten Einflussfaktoren als statistisch signifikant für das progressionsfreie Intervall.

Tabelle 21: Ergebnisse der Cox-Regression zum Einfluß auf das progressionsfreie Intervall

Parameter		p-Wert	Relatives Risiko	95% Konfidenzintervall
Remissionsstatus	SD versus CR+PR	p<0,001	1,857	1,065-3,237
	PD versus CR+PR		49,285	20,152-120,537
Anzahl betroffener Organsysteme (≥ 2 versus 1)		p=0,025	1,79	1,077-2,973
s-HER-2/neu-Spiegel (≥ 18 ng/ml versus <18 ng/ml)		p=0,01	2,344	1,450-3,788

Als letzter wichtiger Aspekt soll noch die Qualität des Monitorings durch die gewählten 4 Serumparameter beschrieben werden. Statistisch wurde hierfür die nichtparametrische Varianzanalyse für Meßwiederholungen nach Brunner angewandt und nachfolgende 3 Fragestellungen untersucht: Gruppeneffekt (Einfluß der best response BR), Zeiteffekt sowie Wechselwirkungen (WW) zwischen Gruppe und Zeit. Es gelten die üblichen Bedingungen für die statistische Signifikanz mit $\alpha=0,05$, wobei bei paarweisen Vergleichen nach Bonferroni-Holm adjustiert wurde. In Tabelle 22 sind diese Ergebnisse zusammengefaßt (fett gedruckte p-Werte sind statistisch signifikant) und werden danach an einigen Beispielen illustriert. Es kann festgestellt werden, daß s-EGFR zur Verlaufsbeurteilung ungeeignet ist. s-uPA und s-HER-2/neu sind in der zeitlichen Verlaufsbeurteilung nützlich, können aber kaum zwischen den einzelnen Responsegruppen unterscheiden. Der beste Monitoringparameter ist CA 27.29, welches zwischen den einzelnen Responsegruppen unterschiedliche longitudinale Verläufe detektieren läßt.

Tabelle 22: Ergebnisse der Varianzanalyse für Meßwiederholungen von baseline zum Zeitpunkt der best response (paarweise Vergleiche wurden nach Bonferroni-Holm adjustiert: $0,05/6=0,0083$, $0,05/5=0,01$, $0,05/4=0,0125$, $0,05/3=0,0167$, $0,05/2=0,025$)

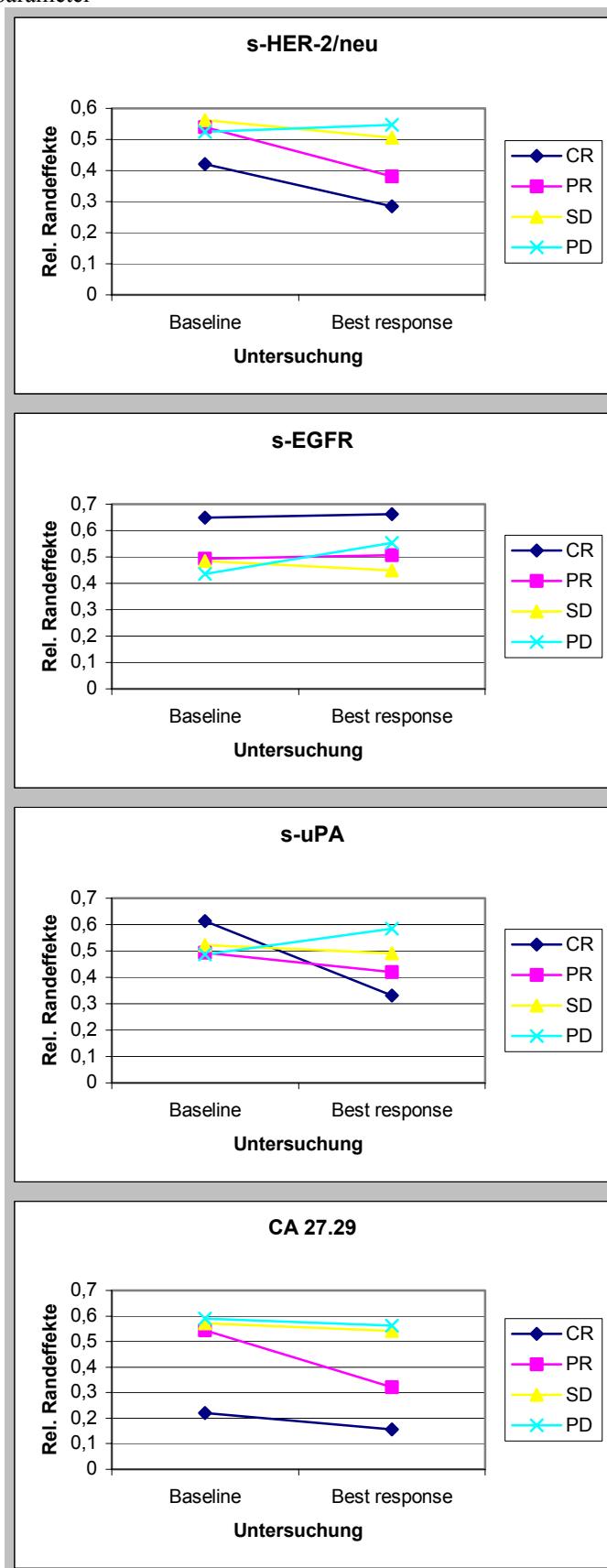
Verlauf über baseline bis Zeitpunkt der best response	Best response- Gruppen	Einfluß- faktor	p-Werte
s-EGFR	CR, PR, SD, PD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,119 0,459 0,491
s-uPA	CR, PR, SD, PD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,653 0,038 0,004
paarweise	CR – PR	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,808 0,003 0,087
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,637 0,004 0,023
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,372 0,100 0,001
	PR – SD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,442 0,207 0,623
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,212 0,806 0,055
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,677 0,380 0,075
	SD – PD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,076 0,003 0,105
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,172 0,002 0,818
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,032 0,032 0,362
	CR – PD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,033 0,188 0,069
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,268 0,002 0,142
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,272 0,043 0,007
	SD – PD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,984 0,553 0,169
s-HER-2/neu	CR, PR, SD, PD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,076 0,003 0,105
paarweise	CR – PR	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,172 0,002 0,818
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,032 0,032 0,362
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,033 0,188 0,069
	PR – SD	Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,268 0,002 0,142
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,272 0,043 0,007
		Best response Zeitverlauf Wechselwirkung	0,984 0,553 0,169

Fortsetzung Tabelle 22:

Verlauf über baseline bis Zeitpunkt der best response	Best response-Gruppen	Einflußfaktor	p-Werte
CA 27.29 paarweise	CR, PR, SD, PD	Best response	<0,001
		Zeitverlauf	<0,001
		Wechselwirkung	0,002
	CR – PR	Best response	<0,001
		Zeitverlauf	<0,001
		Wechselwirkung	0,013
	CR – SD	Best response	<0,001
		Zeitverlauf	0,112
		Wechselwirkung	0,554
	CR – PD	Best response	<0,001
		Zeitverlauf	0,137
		Wechselwirkung	0,540
	PR – SD	Best response	0,051
		Zeitverlauf	<0,001
		Wechselwirkung	<0,001
	PR – PD	Best response	0,031
		Zeitverlauf	<0,001
		Wechselwirkung	0,001
	SD – PD	Best response	0,779
		Zeitverlauf	0,296
		Wechselwirkung	0,961

Die Abbildung 32 stellt die gerade numerisch beschriebenen Verläufe mit Hilfe der relativen Randeffekte für alle untersuchten Serummarker graphisch dar. Wie bereits in der Table-Studie beschrieben, bedeuten Werte um 0,5, daß sich die Meßwerte zum Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zu allen gepoolten Ergebnissen nicht unterscheiden. Man sieht für s-EGFR, daß sich für keine Responsegruppe im Zeitverlauf ein relevanter Unterschied ergibt. Wie auch schon aus Tabelle 22 ersichtlich, heben sich in bezug auf s-uPA insbesondere die Patientinnen mit CR von allen anderen Untergruppen ab; ihre Kurve kreuzt alle drei anderen Kurven. Für s-HER-2/neu ergibt sich eine ähnlich Konstellation: Hier fallen die Serumwerte von Patientinnen mit objektiver Remission (PR/CR) deutlich ab, während die PD-Kurve anstieg. Interessant ist auch, daß alle Kurven bis auf die Gruppe mit CR von einem nahezu identischen Ausgangspunkt starten. Ähnliches gilt auch für CA 27.29, allerdings mit noch akzentuierterer Steilheit der Kurven, insbesondere für die Patientinnen mit PR. Es ist bemerkenswert, daß sich die Gruppe SD nicht von der Gruppe PD unterscheiden läßt. Dies war mit keinem der untersuchten Serumparameter möglich.

Abbildung 32: Relative Randeffekte der longitudinalen Verläufe von baseline bis zum Zeitpunkt der best response für alle Serumparameter



5.8.3. Herceptin®-Therapie

Da sich in der gerade beschriebenen Untersuchung zum Monitoring unter verschiedenen Chemotherapien ohne Herceptin herausgestellt hatte, daß s-HER-2/neu sich zur zeitlichen Verlaufsbeurteilung eignet, aber keine gute Unterscheidung in die verschiedenen Remissionsgruppen erlaubt, wurden für die Betrachtung der Herceptin-Patientinnen die Remissionsbeurteilungen SD, PR und CR im Sinne eines Ausbleibens einer Progression bzw. im Sinne eines klinischen Nutzens zusammengefaßt und im folgenden dichotom unterschieden in Patientinnen mit PD oder CB (clinical benefit).

Insgesamt standen die Daten und Seren von 54 Patientinnen unter einer Herceptin-Monotherapie oder einer Kombination von Herceptin plus Chemotherapie zur Verfügung (siehe Tabelle 23). In kleineren, vorläufigen Analysen sollten 2 Fragen angegangen werden: Korrelieren die Ereignisse einer Progression bzw. des Fehlens der Progression der Erkrankung mit einem mehr als 15%-igem Anstieg oder weniger als 15%-igem Anstieg von s-HER-2/neu im Vergleich zur letzten Voruntersuchung (31-33)? Entscheidend für diesen Ansatz war die visit-per-visit-Analyse über einen langfristigen Verlauf. Als zweiter Aspekt wurde hinterfragt, ob ein früher, relativer Abfall der s-HER-2/neu-Konzentration einen Ausblick auf das Ansprechen auf die Herceptin-basierte Therapie gibt.

Für die visit-per-visit-Analyse wurden 17 Charité-Patientinnen ausgewählt, da sie die längsten Serumverläufe aufwiesen. Die s-HER-2/neu-baseline-Konzentrationen reichten von 11,1-2329,6 ng/ml (Median: 53,5 ng/ml; Mittelwert: 351 ng/ml). Insgesamt konnte von 55 Zeitpunkten eine biochemische und klinische Konkordanzanalyse durchgeführt werden. Ausgehend von einem Anstieg bzw. fehlendem Anstieg von s-HER-2/neu um 15% im Vergleich zur letzten Untersuchung fanden wir eine Übereinstimmung des restagings mit dem Serumverlauf von 78,2%. Die positive Prädiktivität lag bei 81,8% und die negative Prädiktivität bei 63,6% (für weitere statistische Angaben siehe Tabelle 24 und Tabelle 25). Ein Beispiel für den s-HER-2/neu-Verlauf einer der Herceptin-Patientinnen ist in Abbildung 33 dargestellt.

Tabelle 23: Demographische Angaben zu den Herceptin-Patientinnen

Parameter		Gesamt (%)	
Operation	modifiziert radikale Mastektomie	54	
	brusterhaltend	15	
Histologie	invasiv duktal	67	
	inflammatorisch	0	
	medullär	3	
	andere	30	
Pathologisches staging	T	Tis	6
		1-2	52
		3-4	26
		x	16
	N	0	11
		≥1	69
		x	19
	M	0	61
		1	21
	x	18	
Grading	G	1	5
		>1	70
		x	25
Rezeptorstatus	ER oder PR positiv		50
	ER und PR negativ		26
	Unbekannt		24
HER-2/neu-Status	IHC +1		2
	IHC +2		19
	IHC +3		65
	FISH +		4
	unbekannt		10
Menopausenstatus	prämenopausal		22
	perimenopausal		31
	postmenopausal		43
	unbekannt		2
Metastasen zu Studienbeginn	Anzahl	1	15
	beteiligter	2	26
	Organsysteme	>2	59
	Dominanz	Viszera	72
		Weichteile	15
		Knochen	13
Adjuvante Chemotherapie	ja		72
Hormontherapie	adjuvant		33
	palliativ		82
Radiatio	adjuvant		50
	palliativ		30

Tabelle 24: Therapieansprechen und s-HER-2/neu-Verlauf (p<0,005)

Veränderung von s-HER-2/neu zu 55 Zeitpunkten	PD	CB	Gesamt
≥15% Anstieg	7	4	11
<15% Anstieg	8	36	44
Gesamt	15	40	55

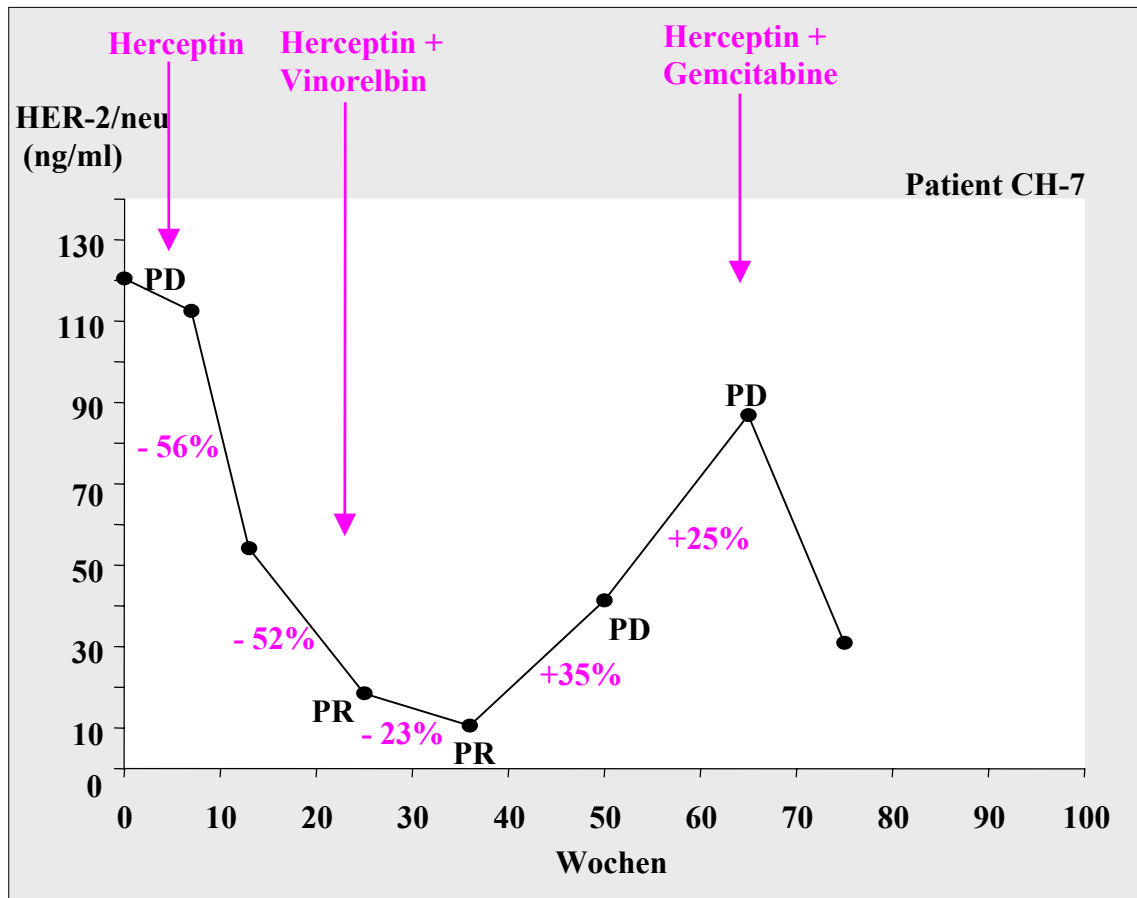
Die Daten aus dieser Vierfeldertafel lassen sich in folgende statistische Angaben zum Langzeitmonitoring durch s-HER-2/neu zusammenfassen.

Tabelle 25: Qualität des Monitorings unter Herceptin-Therapie

	Prozentsatz	Konfidenzintervall	
Konkordanz	78,2%	65,7%	87,1%
Prädiktivität für CB	81,8%	69,7%	89,8%
Prädiktivität für PD	63,3%	50,4%	75,0%
Sensitivität für CB	90,0%	79,3%	95,5%
Spezifität für CB	46,7%	34,2%	59,7%

Die Kasuistik in Abbildung 33 zeigt, daß der gewählte relative Unterschied für die visit-per-visit-Analyse von 15% über einen sehr großen Bereich der s-HER-2/neu-Konzentrationen sinnvoll ist und auch noch um den oberen cut-off-Wert funktionieren kann, wenn im Laufe einer Response die relativen Unterschiede von visit zu visit immer geringer werden.

Abbildung 33: Kasuistik zum Monitoring mit s-HER-2/neu unter Herceptin-Therapie



Ganz ähnlich wie auch schon bei der Monitoringanalyse unter Chemotherapie allein kann man also für das Monitoring unter Herceptin-Therapie feststellen, daß die Verlässlichkeit der s-HER-2/neu-Messung gut, aber sicherlich nicht sehr gut ist. Es muß betont werden, daß es sich hier aufgrund der moderaten Fallzahlen nur um eine vorläufige Untersuchung handeln kann, die insbesondere den Vergleich mit CA 27.29 noch nicht erlaubt. Dieser wird jedoch aktuell in der im Anhang unter Projekt 2 beschriebenen, prospektiven Multicenter-Studie in einem sehr robusten Ansatz untersucht. Die Ergebnisse werden im 4. Quartal 2003 erwartet. Besonders interessant dürften die Serumverläufe von s-HER-2/neu bei den sogenannten „tumormarkernegativen“ Patientinnen sein, die kein CA 27.29 exprimieren. Hier wurden mehrfach Patientinnen beobachtet, die hohe s-HER-2/neu-Spiegel zeigen, bei denen aber kein erhöhtes CA 27.29 im Serum nachweisbar ist.

Von 45 Herceptin-Patientinnen standen sowohl die klinischen Daten wie auch enge Probenabnahmeintervalle innerhalb der ersten 5 Wochen nach Therapiebeginn zur Verfügung. Insgesamt zeigten 16/45 (35,6%) Frauen ein objektives Ansprechen (PR oder CR) auf die Herceptin-basierte Therapie, 14/45 (31,1%) erreichten eine Stabilisierung der Erkrankung und 15/45 (33,3%) waren primär progredient. Dies entspricht einem Anteil an Patientinnen mit klinischem Benefit (CB=CR+PR+SD) von 66,7%.

Die mittlere s-HER-2/neu-Konzentration bei Therapiebeginn lag bei 284,4 ng/ml bei einem Median von 22,4 ng/ml. Wir konnten keinen Bezug zwischen dem Ansprechen und der Höhe des s-HER-2/neu-baseline-Spiegels feststellen ($p>0,05$; siehe Tabelle 26). Es fand sich auch kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf die Herceptin-Therapie und den absoluten oder relativen s-HER-2/neu-Konzentrationen in der 2. Woche nach Therapiebeginn.

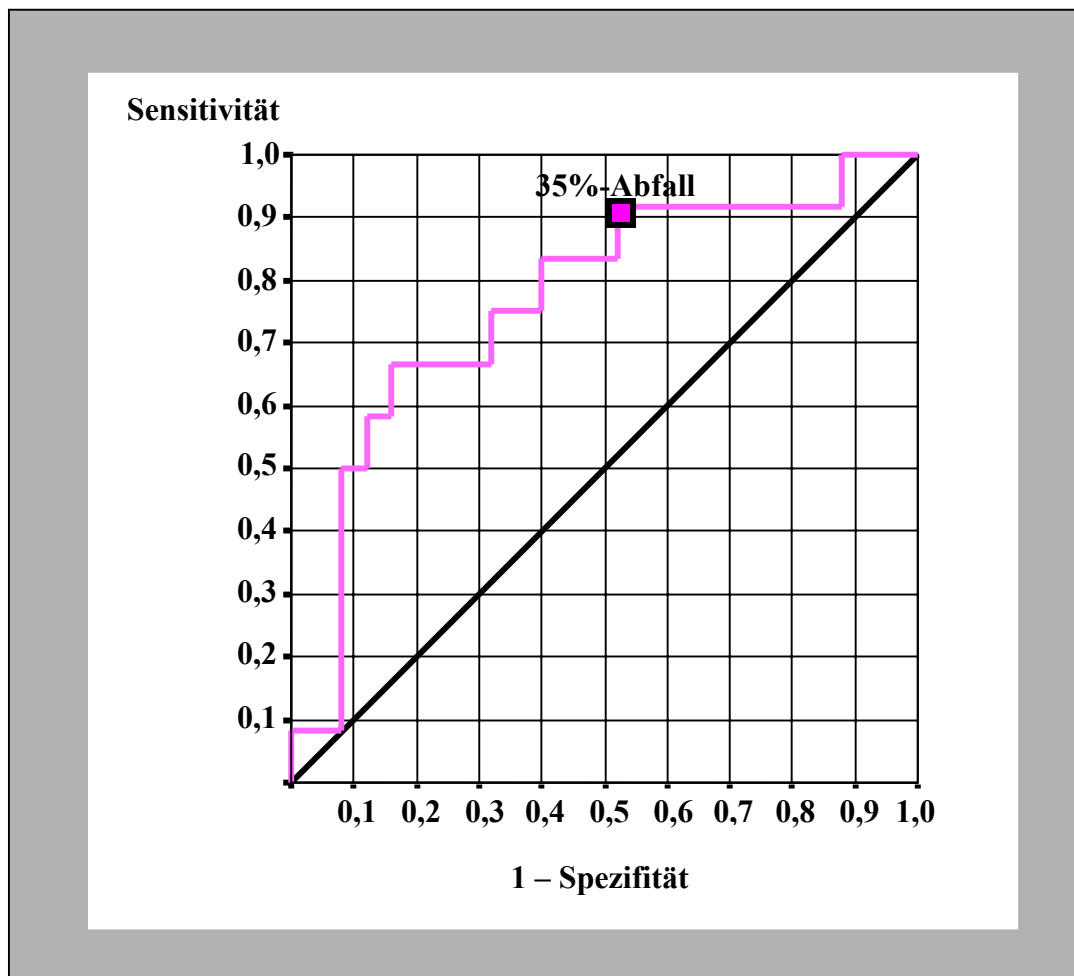
Tabelle 26: Darstellung der Verteilung von Ansprechen auf Herceptin-Therapie und Höhe des baseline-s-HER-2/neu-Spiegels ($p>0,05$)

Baseline s-HER-2/neu	Best response				Gesamt
		CD/PR	SD	PD	
<15ng/ml	n (%)	3 (23,1%)	6 (46,2%)	4 (30,8%)	13
15-50 ng/ml	n (%)	6 (35,3%)	5 (29,4%)	6 (35,3%)	17
>50 ng/ml	n (%)	7 (46,7%)	3 (20,0%)	5 (33,3%)	15
Gesamt	n (%)	16 (35,6%)	14 (31,1%)	15 (33,3%)	45

Für die s-HER-2/neu-Konzentrationen zum Zeitpunkt Woche 4 nach Therapiebeginn ergab sich allerdings eine Assoziation zwischen Ansprechen und dem relativen Abfall des s-HER-2/neu-Spiegels. Je mehr die s-HER-2/neu-Konzentrationen in der Woche 4 im Vergleich zu Therapiebeginn angestiegen waren bzw. je weniger sie abfielen, desto wahrscheinlicher war eine primäre Progression. Die ROC-Kurve (area under the curve

AUC=0,78, CI: 0,6-0,94) für die Unterscheidung von Patientinnen mit PD versus Patientinnen mit CB zeigte, daß die relative s-HER-2/neu-Konzentration zum Zeitpunkt Woche 4 statistisch signifikant zwischen diesen beiden Responsegruppen unterscheiden kann (siehe Abbildung 34). Der Verlauf der ROC-Kurve zeigt, daß bei einer relativen s-HER-2/neu-Konzentration von 65% im Vergleich zu Therapiebeginn (entsprechend einem Abfall von 35%) die Sensitivität für das Erkennen einer Progression bei 90% liegt bei einer Spezifität von 48%. Berücksichtigten wir nur Patientinnen mit objektivem Ansprechen und primärer Progression, stieg die AUC auf 0,82 (CI: 0,66-0,99) an, die Sensitivität lag bei 92%, die Spezifität stieg auf 64% (ROC-Kurve nicht abgebildet).

Abbildung 34: ROC-Kurve zur Unterscheidung von Progression und klinischem Benefit durch den relativen s-HER-2/neu-Abfall zur Woche 4



Aus all diesen Daten zum Monitoring einer Herceptin-basierten Therapie kann man folgern, daß ein Anstieg der s-HER-2/neu-Konzentration unter Therapie mit sehr hoher Sicherheit auf eine Progression hinweist. Auch wenn s-HER-2/neu innerhalb von 4 Wochen nicht auf mindestens 65% der Eingangskonzentration abfällt, ist an dem therapeutischen Nutzen zu zweifeln und ein frühes restaging einzuleiten.

5.9. Konkordanzanalysen verschiedener Methoden der HER-2/neu-Bestimmung im Hinblick auf die Patientinnenselektion für eine Herceptin-Therapie

Insbesondere für das metastasierte Mammakarzinom treten individualisierte Therapieformen immer mehr in den Vordergrund. Gegenwärtig stehen 2 spezifische Therapiemodalitäten mit nachgewiesenem Überlebensvorteil zur Verfügung. Dabei handelt es sich zum einen um die Wachstumshemmung durch direkte oder indirekte Blockade der Steroidhormonrezeptoren, zum anderen um den monoklonalen anti-HER-2/neu-Antikörper Herceptin (22;63-66). Für jede Form der spezifischen Therapie muß der Nachweis des Zielproteins reliabel, valide und reproduzierbar sein. Falsch positive oder falsch negative Ergebnisse führen unweigerlich zu einer inadäquaten Patientenselektion. Vor der Therapie mit Herceptin muß sichergestellt sein, daß die Tumorerkrankung bei der individuellen Patientin tatsächlich HER-2/neu überexprimiert. Der Nachweis erfolgt im allgemeinen durch den Nachweis der HER-2/neu-Überamplifikation und/oder den Nachweis der HER-2/neu-Proteinüberexpression. Die Serummessung von HER-2/neu ist bislang in größeren klinischen Studien relativ unbeachtet geblieben. Wir stellten in den folgenden Untersuchungen die Frage, ob die s-HER-2/neu-Messung die Gewebetestung ggf. ersetzen oder zumindest sinnvoll ergänzen kann.

5.9.1. IHC des Primärtumors und s-HER-2/neu im Stadium IV

Zunächst einmal war es notwendig, den Bezug zwischen der HER-2/neu-Positivität im Gewebe und im Serum zu überprüfen. Hierfür wurden 101 Seren zum Zeitpunkt der gesicherten Progression von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und bekanntem HER-2/neu-Gewebestatus aufgemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt. Es handelt sich um ein selektiertes Patientinnengut, von dem ein Großteil aufgrund der bekannten HER-2/neu-Positivität an die universitäre Einrichtung zur Einleitung einer Herceptin-Therapie verwiesen wurde. Insofern läßt sich der hohe Anteil von HER-2/neu-positiven Patientinnen mit mehr als 60% erklären.

Tabelle 27: Übersicht über HER-2/neu-Proteinüberexpression und s-HER-2/neu-Spiegel bei 101 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die Spalten).

Gewebe Serum	HER-2/neu IHC +2	HER-2/neu IHC +3	HER-2/neu IHC negativ	Gesamt
s-HER-2/neu positiv	28 (68%)	14 (74%)	17 (41,5%)	59 (58,4%)
s-HER-2/neu negativ	13 (32%)	5 (26%)	24 (58,5%)	42 (41,6%)
Gesamt	41	19	41	101

Es zeigte sich, daß rund 70% der Patientinnen mit HER-2/neu-Überexpression im Gewebe unabhängig vom IHC-Score +2 oder +3 zum Zeitpunkt der Progression einer Fernmetastasierung tatsächlich auch einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel aufweisen. Wäre das Gewebeergebnis also nicht bekannt, würde man bei einer Patientinnenselektion anhand des s-HER-2/neu-Status viele Patientinnen für eine adäquate Therapie verlieren. Dieses Phänomen wird als „non-shedding“ bezeichnet. Die Ursachen hierfür sind weitgehend unbekannt. Andererseits findet sich ein erhöhter s-HER-2/neu-Spiegel auch bei einer relativ hohen Anzahl (41,5%) an HER-2/neu-gewebenegativen Frauen. Inwieweit es hierfür Erklärungen geben könnte, soll in der nachfolgenden Konkordanzanalyse von IHC, FISH und s-HER-2/neu an Primärtumoren und ihren Metastasen diskutiert werden.

5.9.2. Subgruppenanalyse mit IHC, computerisierter IHC-Befundung, FISH und s-HER-2/neu im Stadium IV

Bislang beruhen die spezifischen Therapien des Mammakarzinoms auf dem pathophysiologischen Dogma der Klonalität. Für den Einsatz von Hormontherapien oder Herceptin beim metastasierten Mammakarzinom verläßt man sich fast ausschließlich auf den Proteinnachweis am Primärtumor, da meist kein Gewebe einer Fernmetastase vorliegt, allenfalls eine zusätzliche Biopsie aus einem Lokalrezidiv. Der Grundsatz der Klonalität wird aber zunehmend durch die Erkenntnis eingeschränkt, daß sich Tumore während ihrer Entstehung und auch noch während der Metastasierung verändern, was die Patientenselektion und damit auch die Wirksamkeit und Sicherheit spezifischer Therapieformen kompromittieren könnte.

In der nachfolgenden Analyse nutzten wir alle 3 standardisierten Nachweismethoden von HER-2/neu (IHC, FISH, ELISA), um das gesamte verfügbare Gewebematerial und Serum von 30 Mammakarzinompatientinnen auf den HER-2/neu-Status zu untersuchen. Wir hatten folgende Fragen: Gibt es diskordante Gewebeergebnisse zwischen IHC und FISH? Kann eine automatisierte IHC-Befundung die Testergebnisse verbessern? Wie korreliert der s-HER-2/neu-Spiegel mit IHC and FISH? Gibt die s-HER-2/neu-Messung als “real time”-Analyse im Stadium IV zusätzliche Information zur HER-2/neu-Gewebetestung und ggf. eine höhere Therapiesicherheit?

Die demographischen Angaben der 30 Patientinnen sind in Tabelle 28 aufgeführt. Ungefähr die Hälfte aller Frauen waren entweder ER- oder PR-positiv. Die Mehrzahl war postmenopausal und bot eine weitgehend viszerale Erkrankung. Das FISH-Ergebnis wurde für alle anderen HER-2/neu-Ergebnisse als Referenzmethode gewählt. Tabelle 29 zeigt die Übereinstimmung der FISH-Ergebnisse und der konventionell befundeten IHC-Schnitte (83,6%) sowie die Konkordanz der FISH-Ergebnisse und der computerisiert befundeten IHC-Schnitte (88,5%). Die Korrelation zwischen den unstandardisierten IHC-Techniken und den anderen Nachweismethoden war relativ schlecht mit einer Konkordanz von 73,8% zur FISH-Methodik und 80,3% zum HercepTest. Die beste Übereinstimmung von 95,1% ergab sich für den HercepTest in der konventionellen und der computerisierten Befundung.

Tabelle 28: Demographische Daten zu den Patientinnen in der HER-2/neu-Konkordanzanalyse

Parameter			Gesamt n=30 (%)	
Alter bei Erstdiagnose	Range	31-69		
	Mittelwert	50		
Operation	modifiziert radikale Mastektomie	20	67%	
	brusterhaltend	9	30%	
	keine	1	3%	
Histologie	invasiv duktal	25	83%	
	inflammatorisch	0	0	
	medullar	0	0	
	andere	5	17%	
Tumorstadium	T	1-2	22	74%
		3-4	7	23%
		x	1	3%
	N	0	5	17%
		≥1	24	80%
		x	1	3%
Grading	M	0	25	83%
		1	5	17%
	G	1	1	3%
		≥2	25	84%
		x	4	13%
Rezeptorstatus	ER oder PR positiv		14	47%
	ER und PR negativ		9	30%
	unbekannt		7	23%
Menopausenstatus	prämenopausal		6	20%
	postmenopausal		24	80%
Alter bei s-HER-2/neu-Messung	Range	35-71		
	Mittelwert	54		
Metastasen zu Studienbeginn	Anzahl beteiligter Organe	1	11	37%
		2	8	28%
		>2	11	37%
	Dominanz	Viszera	21	70%
		Weichteile	8	27%
		Knochen	1	3%
Vorangegangene Chemotherapie	Adjuvante Chx		18	60%
	vor Erstlinientherapie		10	33%
	vor Zweitlinientherapie		12	40%
	vor Drittlinientherapie		8	27%
Vorangegangene Hormontherapie	adjuvant		10	33%
	palliativ		11	37%
Radiatio	adjuvant		7	23%
	palliativ		11	37%

Tabelle 29: Konkordanz der FISH-Ergebnisse in Relation zu A: der manuellen Befundung des DAKO HercepTests (Konkordanz 83,6%); B: der computerisierten Befundung auf dem ACIS-System (Konkordanz 88,5%). Die beste Konkordanz ergibt sich zwischen der manuellen und der automatisierten Befundung in C (Konkordanz 95,1%).

A

FISH DAKO	Positiv (>4 Genkopien)	Negativ	Gesamt
Positiv (+2 oder +3)	8	4	12
Negativ	6	43	49
Gesamt	14	47	61

B

FISH ACIS	Positiv (>4 Genkopien)	Negativ	Gesamt
Positiv (>2,0)	12	3	15
Negativ	3	43	46
Gesamt	14	47	61

C

DAKO ACIS	Positiv (+2 oder +3)	Negativ	Gesamt
Positiv (>2,0)	12	3	15
Negativ	0	46	46
Gesamt	12	49	61

Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen zu dieser Konkordanzanalyse mit Hilfe des Konkordanzkoeffizienten κ sind in Tabelle 30 zusammengefaßt. Die unstandardisierten IHC-Methoden stimmen nur moderat mit der standardisierten IHC oder der FISH überein,

was den gegenwärtigen klinischen Standard bestätigt. Der Konkordanzkoeffizient κ wird für die automatisierte IHC im Vergleich zur FISH besser als beim Vergleich der konventionellen IHC-Befundung in Relation zur FISH, wobei die Konfidenzintervalle allerdings überlappen. Generell kann aber festgestellt werden, daß die manuelle Befundung durch den Pathologen und die automatisierte Evaluation auf dem ACIS-System sehr gut übereinstimmen.

Tabelle 30: Konkordanzkoeffizienten zu allen Vergleichen der HER-2/neu-Gewebeergebnisse mit unterschiedlichen Methoden und Befundungsansätzen (manuell versus computerisiert)

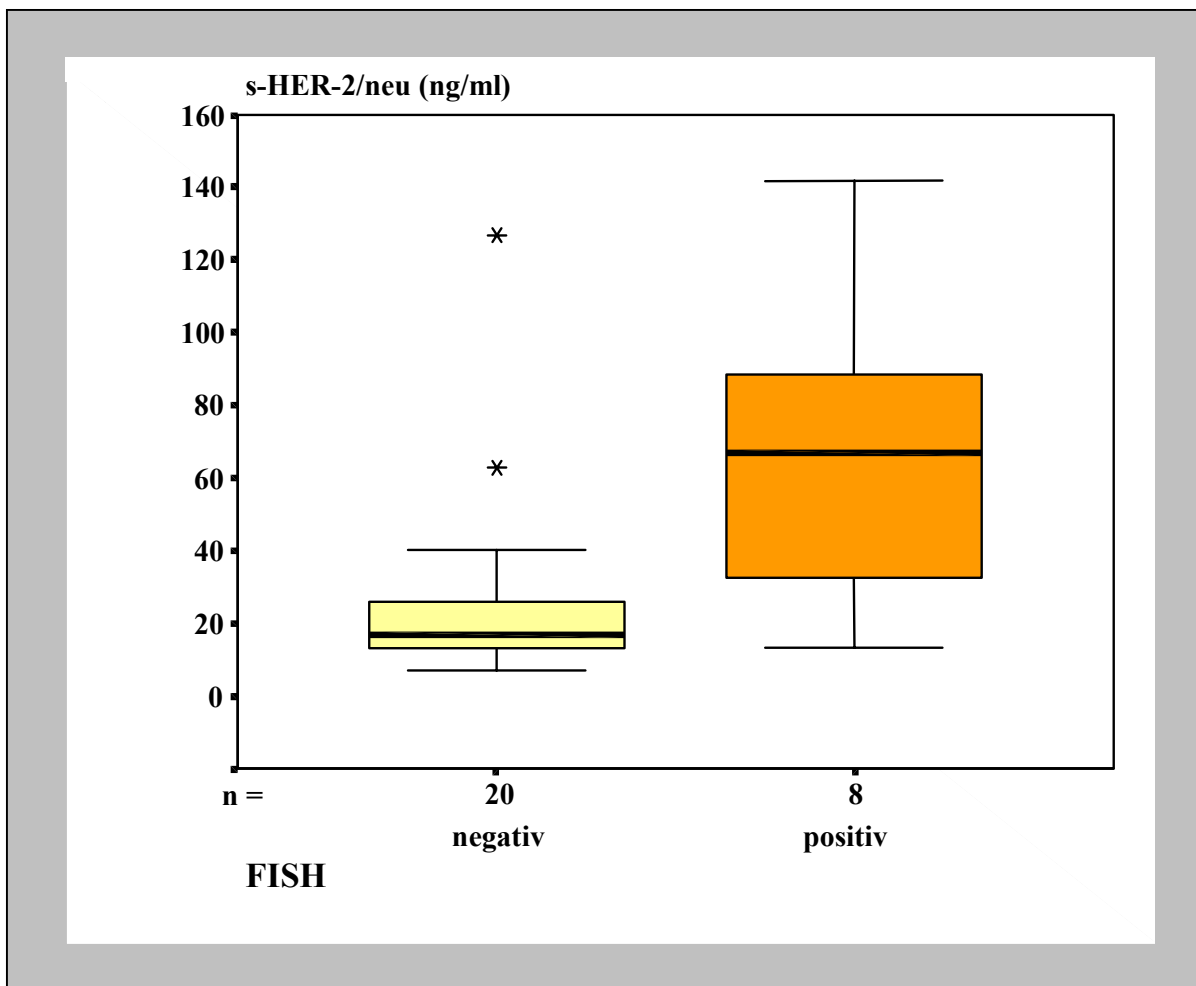
Methodenvergleich	Konkordanz (%)	Interpretation	Koeffizient κ	Konfidenzintervall	p-Wert
DAKO versus unstandardisierte IHC	73,8	deutlich	0,42	0,21–0,63	0,00013
FISH versus unstandardisierte IHC	80,3	deutlich	0,57	0,37–0,76	<0,0001
FISH versus DAKO	83,6	deutlich	0,51	0,24–0,77	<0,0001
FISH versus ACIS	88,5	stark	0,68	0,46–0,90	<0,0001
ACIS versus DAKO	95,1	fast vollständig	0,85	0,70–1,00	<0,0001

Nach dieser Konkordanzanalyse zu den verschiedenen Gewebeergebnissen und Befundungsoptionen schlossen wir nun die s-HER-2/neu-Spiegel zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung in die Betrachtung mit ein. Als Referenzbefund für den HER-2/neu-Gewebestatus wählten wir hierbei für jede Patientin das Ergebnis mit dem höchsten Score aus. Das zugehörige Material durfte sowohl vom Primärtumor als auch aus Lokalrezidiven oder Fernmetastasen stammen.

Serumergebnisse standen von 28 Frauen zur Verfügung. Der mediane s-HER-2/neu-Spiegel von FISH-positiven Patientinnen lag bei 67 ng/ml und war damit statistisch

signifikant höher als der mediane s-HER-2/neu-Spiegel von FISH-negativen Patientinnen mit 17 ng/ml ($p=0,018$; siehe Abbildung 35).

Abbildung 35: s-HER-2/neu-Spiegel von FISH-positiven Patientinnen im Vergleich zu FISH-negativen Patientinnen



Fast alle Patientinnen mit einem HER-2/neu-gewebepositiven Tumor zeigten auch einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung (siehe Tabelle 31). Ähnlich wie bei der Korrelation von HER-2/neu-Gewebestatus und s-HER-2/neu-Spiegel an den unter 5.9.1. beschriebenen Patientinnen fanden wir auch hier einen Anteil an non-sheddern von rund 20%.

Tabelle 31: Korrelation von HER-2/neu-Gewebestatus mit unterschiedlichen Nachweismethoden und s-HER-2/neu-Spiegel zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung

A

FISH Serum	Positiv (>4 Genkopien)	Negativ	Gesamt
Positiv (≥ 15 ng/ml)	7	14	21
Negativ	1	6	7
Gesamt	8	20	28

B

DAKO Serum	Positiv (+2 oder +3)	Negativ	Gesamt
Positiv (≥ 15 ng/ml)	8	13	21
Negativ	2	5	7
Gesamt	10	18	28

C

ACIS Serum	Positiv ($\geq 2,0$)	Negativ	Gesamt
Positiv (≥ 15 ng/ml)	9	12	21
Negativ	2	5	7
Gesamt	11	17	28

Ungefähr zwei Drittel (14/20) der Patientinnen mit einem HER-2/neu-negativen Tumor zeigten einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel im Stadium der Fernmetastasierung. Dieser “Wechsel” des HER-2/neu-Status von einem negativen Primärtumor zur Serumpositivität

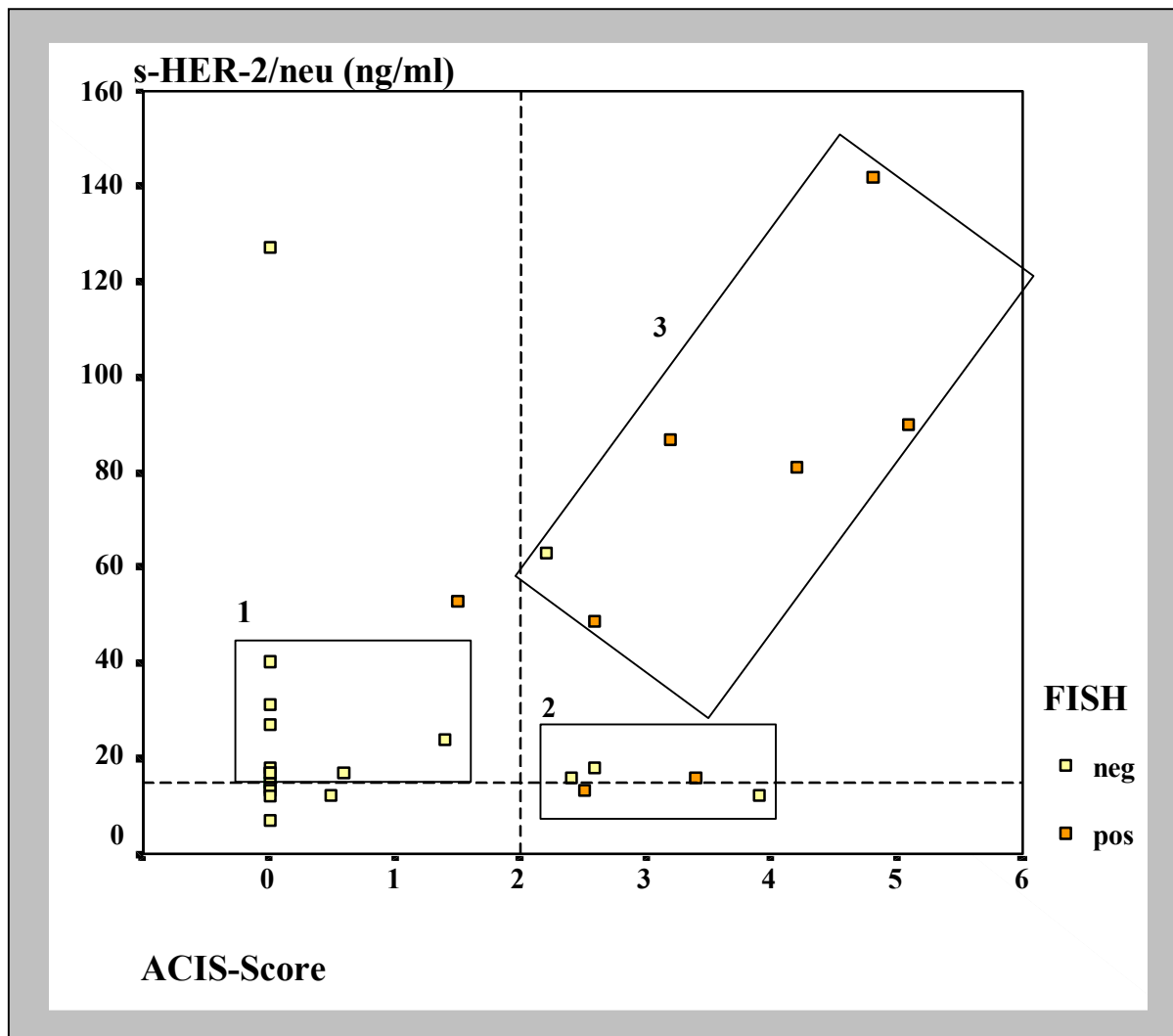
im Stadium IV war für alle Nachweismethoden im Gewebe im Vergleich zum Serum statistisch signifikant (FISH/Serum: $p=0,001$; DAKO/Serum: $p=0,013$; ACIS/Serum: $p=0,007$). Dies bedeutet, daß es für jede Gewebemethodik (FISH, HercepTest, ACIS) häufiger Wechsel von einem HER-2/neu-negativen Gewebeergebnis zu einem positiven s-HER-2/neu-Spiegel gab als umgekehrt. Es muß betont werden, daß die Daten in den Tabellen 29 und 31 nicht direkt vergleichbar sind. In Tabelle 29 wurde das gleiche Gewebe einzeitig mit 2 verschiedenen Methoden untersucht, während in Tabelle 31 zwei unterschiedliche Materialien zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen und auch anders bearbeitet wurden. Diskrepante Ergebnisse können hier also auf die Unterschiede bezüglich des Gewebes, der Bestimmungsmethode und der Abnahmezeitpunkte zurückzuführen sein. Dies schließt eine biologische Änderung des HER-2/neu-Status während des Fortschritts der Erkrankung ein.

In der Konkordanzanalyse kamen 2 quantitative Methoden zum Einsatz: die IHC-Befundung auf dem ACIS-System und die s-HER-2/neu-Messung. Wir setzten diese Ergebnisse für die FISH-positiven und die FISH-negativen Patientinnen zueinander in Bezug (siehe Abbildung 36). Es fielen 3 distinkte Gruppen auf: Die erste Gruppe clustert um die ACIS-Werte 0-1, entsprechend einem negativen HER-2/neu-Gewebestatus; die entsprechenden s-HER-2/neu-Konzentrationen reichen von 7-40 ng/ml. All diese Patientinnen sind FISH-negativ. Die gering erhöhten s-HER-2/neu-Konzentrationen könnten dabei eine Funktion der Tumorlast sein oder von einer HER-2/neu-Proteinexpression (z. B. +1) stammen, die noch nicht die Einstufung als HER-2/neu-positiv zuläßt. Andererseits kann eine Veränderung des HER-2/neu-Status im Erkrankungsverlauf nicht ausgeschlossen werden. Es ist fragwürdig, ob die Patientin mit dem ACIS-Score von 0 im Primärtumor und einem s-HER-2/neu-Spiegel von 127 ng/ml (8,5-fach über dem cut-off) eine HER-2/neu-negative, *metastasierte* Erkrankung hat.

Die zweite Untergruppe der Patientinnen gruppiert sich um den s-HER-2/neu-Grenzwert von 15 ng/ml. Es handelt sich um „non“- und „low-shedders“, also HER-2/neu-positive Patientinnen laut ACIS-Score und FISH, die nur wenig extrazelluläre Domäne von HER-2/neu in das Serum abgeben. Die Verteilung der dritten Subgruppe ähnelt einer Streuung um eine lineare Regressionsgerade, wobei die Anzahl an Patientinnen leider zu gering

war, eine separate Analyse der ACIS-positiven Patientinnen durchzuführen. Bei der linearen Regression über alle metrischen Ergebnisse ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r=0,50$ (CI: 0,1-0,9; $p=0,007$).

Abbildung 36: Explorative Analyse der metrischen ACIS-IHC-Scores und der s-HER-2/neu-Spiegel (Gruppen 1-3 sind im Text beschrieben)



Abschließend betrachteten wir die Patientinnen im einzelnen auf diskordante Ergebnisse. Bei 64,3% (18/28) der Patientinnen waren alle Gewebeergebnisse stimmig. Bei den übrigen 10/28 Frauen gab es diskrepante Resultate. Wäre das Gewebeergebnis mit dem höchsten HER-2/neu-Score repräsentativ, würde ein erhöhter s-HER-2/neu-Spiegel bei 8/10 dieser Patientinnen die Diagnose der HER-2/neu-Positivität stützen. Tabelle 32 zeigt 15 Beispiele mit allen Geweben und Untersuchungsmethoden, die meistens klar für

Tabelle 32: Beispiele für Patientinnen aus der HER-2/neu-Konkordanzanalyse mit allen untersuchten Materialien in allen Methoden. Die Farben sollen graphisch darstellen, daß HER-2/neu semiquantitativ befundet wird, obwohl eine nicht-dichotome Expression zugrunde liegt.

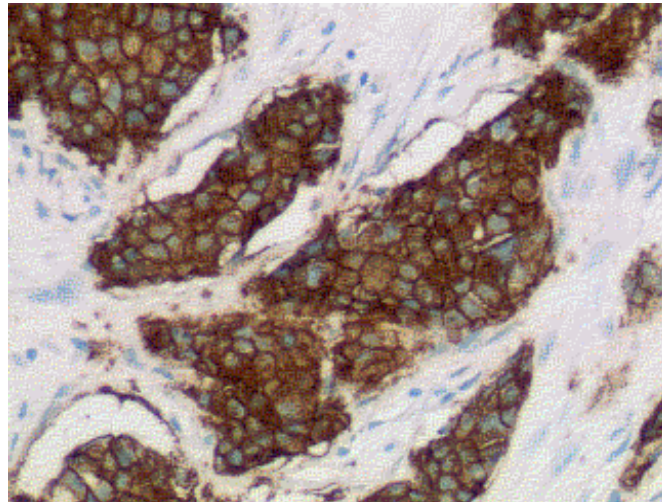
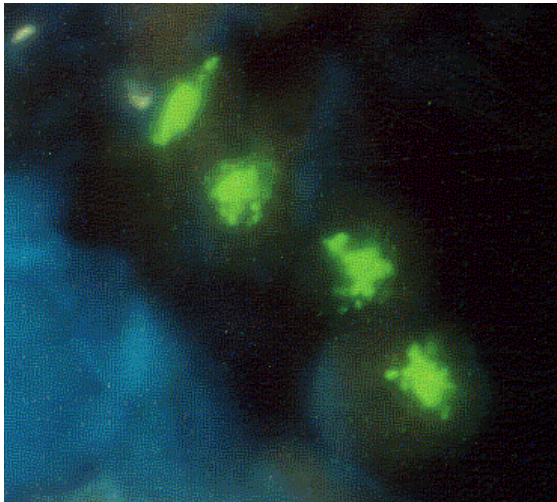
Patientin ID	Tumorgewebe	FISH (Genkopien)	Unstandardisierte IHC	DAKO-Score	ACIS-Score	Serum-HER-2 (ng/ml)	
40SD	Primärtumor links	neg (≤ 4)	1+	0	0	7	Alles negativ
	Regionale LK	neg (≤ 4)	0	0	0		
11DE	Primärtumor rechts	neg (≤ 4)	0	0	0	12	↓
	Regionäre LK	neg (≤ 4)	1+	0	0		
	Lokalrezidiv	neg (≤ 4)	1+	0	0,5		
08BK	Primärtumor rechts	neg (≤ 4)	0	0	0	27	Gewebe negativ & Serum positiv
	Lokalrezidiv rechts	neg (≤ 4)	0	0	0		
	Weichteilmetastase	neg (≤ 4)	0	0	0		
27HB	Primärtumor rechts	neg (≤ 4)	0	0	0	31	↓
	Primärtumor links	neg (≤ 4)	0	0	0		
	Regionäre LK links	neg (≤ 4)	1+	0	0		
	Lokalrezidiv rechts	neg (≤ 4)	0	0	0		
40KA	Primärtumor links	neg (≤ 4)	0	0	0	40	↓
	Regionäre LK	neg (≤ 4)	0	0	0		
13GI	Primärtumor links	neg (≤ 4)	1+	0	1,3	12	↓
	Primärtumor links	neg (≤ 4)	3+	2+	3,9		
15HE	Weichteilmetastase	neg (≤ 4)	3+	0	0,5	16	↓
	Weichteilmetastase	neg (≤ 4)	3+	2+	2,4		
34RB	Primärtumor links	neg (≤ 4)	1+	2+	2,6	18	↓
	Regionäre LK	neg (≤ 4)	0	0	0,6		
49SI	Primärtumor links	neg (≤ 4)	3+	1+	1,4	24	↓
	Regionäre LK	neg (≤ 4)	1+	0	0,8		
	Weichteilmetastase	neg (≤ 4)	3+	0	0,0		
26LR	Regionäre LK	neg (≤ 4)	1+	0	0,0	63	↓
	Regionäre LK	neg (≤ 4)	3+	3+	2,2		
39EJ	Primärtumor rechts	pos (5-10)	3+	2+	3,4	16	↓
	Regionäre LK	pos (5-10)	2+	1+	1,5		
10BP	Regionäre LK	pos (> 10)	3+	1+	1,8	13	↓
	Regionäre LK	pos (> 10)	2+	2-3+	2,5		
33PG	Primärtumor links	pos (> 10)	3+	3+	4,2	81	↓
	Regionäre LK	pos (> 10)	3+	1+	2,7		
38TH	Primärtumor rechts	pos (> 10)	3+	1+	2,8	87	Alles positiv
	Regionäre LK	pos (> 10)	3+	3+	3,2		
44KH	Primärtumor links	pos (> 10)	3+	3+	4,8	142	↓
	Regionäre LK	pos (> 10)	3+	3+	4,3		

negativ gering mäßig hoch

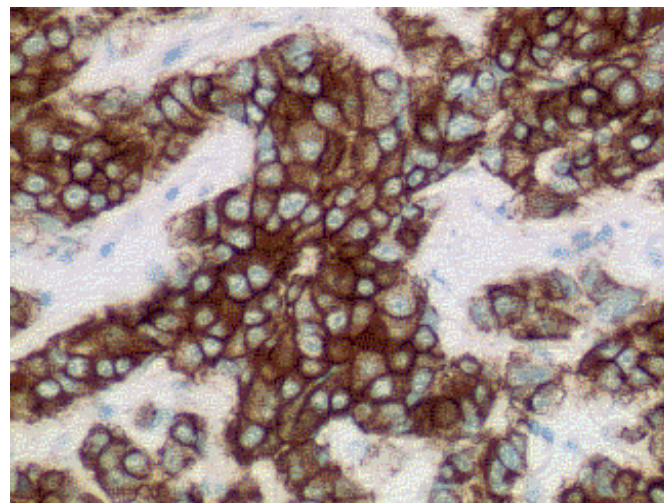
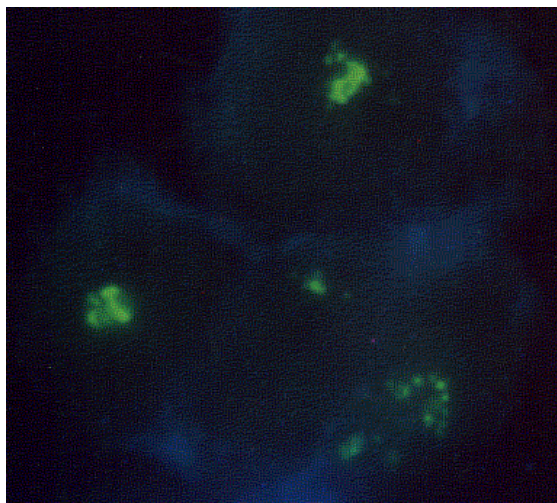
eine HER-2/neu-Negativität (Patientin 40SD) oder Positivität (Patientin 44KH; siehe auch Abbildung 37) sprechen. Bei manchen Patientinnen mit ausschließlich negativen Gewebeergebnissen und einem gering erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel bei Fernmetastasierung (Patientin 08BK) ist dieser am ehesten eine Funktion der Tumorlast. Es gibt aber auch Übergangssituationen (Patientinnen 49SI und 34RB), bei denen der gering erhöhte s-HER-2/neu-Spiegel auf eine geringe HER-2/neu-Expression hinweist, welche die Diagnose der HER-2/neu-Positivität nicht erlaubt.

Abbildung 37: FISH und IHC von Primärtumor (A) und regionärer LK-Metastase (B) der Patientin 44KH. Alle Ergebnisse sind eindeutig HER-2/neu-positiv. Der Serumspiegel bei Fernmetastasierung lag bei 142 ng/ml.

A



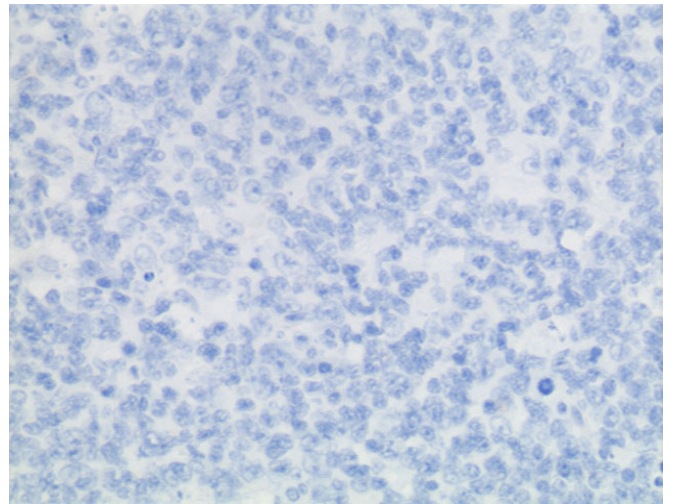
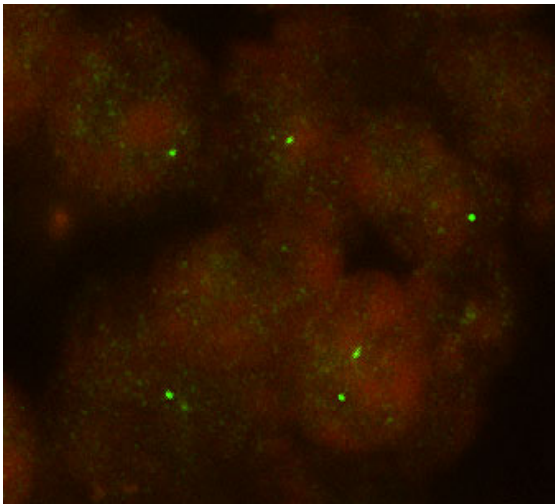
B



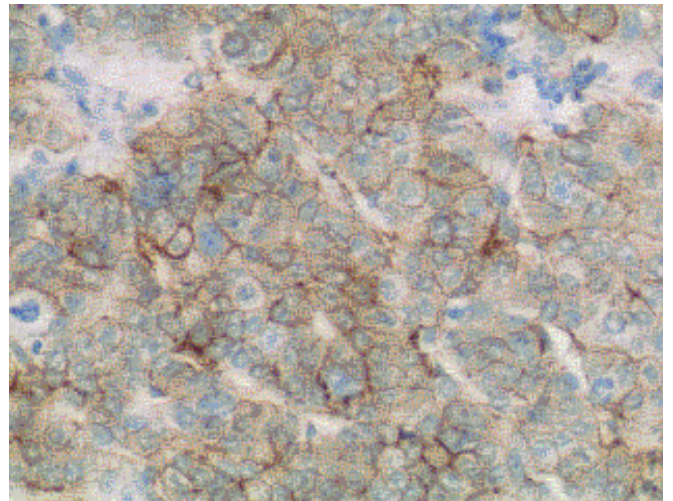
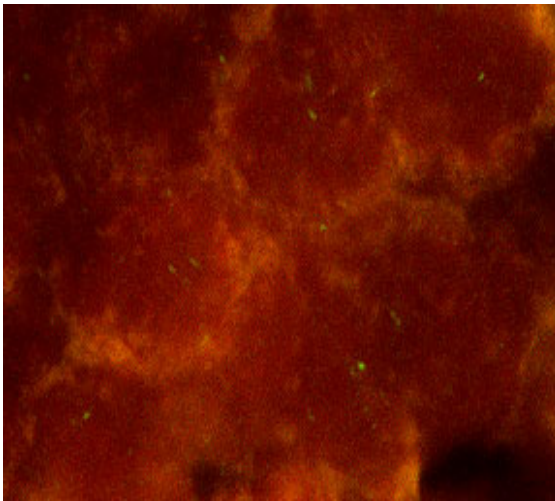
Einige Patientinnen zeigten zwischen unterschiedlichen Paraffinblöcken des gleichen Organs bzw. Gewebes bei gleicher Untersuchungsmethode unterschiedliche Ergebnisse (Patientinnen 15HE und 26LR; siehe auch Abbildung 38). Diese Metastasen waren zueinander heterogen; der DAKO-Score wurde einmal als negativ, bei der benachbarten Metastase als positiv befundet. In beiden Fällen war der Serumspiegel von HER-2/neu erhöht.

Abbildung 38: Weichteilmetastasen (FISH und IHC) der Patientin 15HE. Die IHC in A ist mit dem HercepTest mit 0 befundet, die danebenliegende Metastase in B mit einem Score von +2. Der s-HER-2/neu-Spiegel lag bei 16 ng/ml.

A

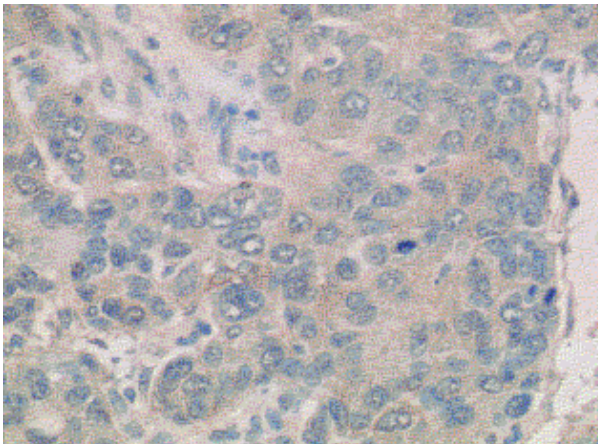
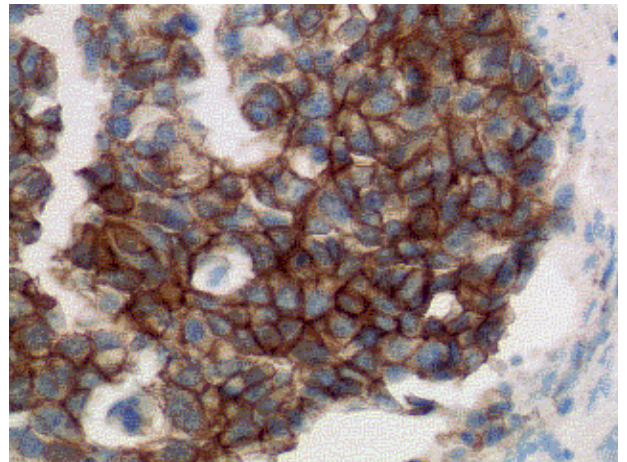
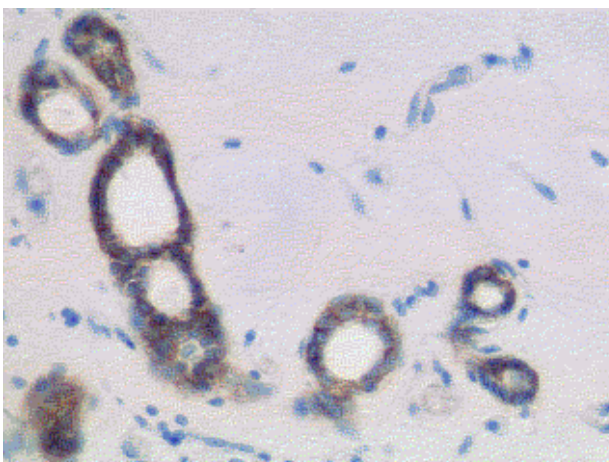


B



Ein ähnlicher Befund wurde auch bei der Patientin 13GI erhoben (siehe Abbildung 39). Der Unterschied bestand nur darin, daß beide abgebildeten Schnitte aus dem gleichen Tumorblock stammten. Interessanterweise war auch das gesunde Gewebe HER-2/neu-positiv, was die Befundung beeinträchtigt haben könnte. Wieder andere Patientinnen zeigten diskrepante Ergebnisse in der HER-2/neu-Expression zwischen dem Primärtumor und seinen regionären Lymphknotenmetastasen (Patientinnen 33PG und 38TH), wobei die computerisierte IHC-Befundung die Ergebnisse des Pathologen nach konventioneller Befundung nicht immer bestätigt hatte.

Abbildung 39: Primärtumor der Patientin 13GI: Während der Paraffinschnitt in A als IHC-negativ eingestuft wurde, lag der Score in B bei +2. Grundsätzlich wurden beide Ergebnisse auf dem ACIS-System bestätigt. Die FISH-Untersuchung war für beide Schnitte negativ. Das präexistierende gesunde Drüsengewebe in C zeigt ebenfalls eine HER-2/neu-Expression.

A**B****C**

Es muß berücksichtigt werden, daß oft kein Tumorblock mehr verfügbar ist, aus dem sich die HER-2/neu-Überexpression bestimmen lassen könnte. Oft muß man auf ungenügendes Tumormaterial zurückgreifen. Betrachtet man die Ergebnisse aus Tabelle 32 ex post und nimmt hypothetisch nur ein Gewebeergebnis als Kriterium für die Entscheidung für oder gegen eine Herceptin-Therapie in der metastasierten Situation, so sieht man, daß dies klinisch relevant häufig zu einer falschen Entscheidung geführt hätte. Eine Berücksichtigung des s-HER-2/neu-Spiegels kann also insbesondere bei erschwerter Diagnostik am Primärtumor eine gute Ergänzung zur Bestimmung des HER-2/neu-Status sein. Es bleibt aber abschließend festzustellen, daß in rund 70% der Fälle alle HER-2/neu-Ergebnisse übereinstimmten. Die Gewebediagnostik für HER-2/neu muß also für die Mehrheit der Patientinnen als sicher angesehen werden.

6. Diskussion

Die Erkenntnisse der Molekularbiologie haben in den letzten beiden Jahrzehnten die Behandlung des Mammakarzinoms erheblich verbessert. Nach dem Steroidhormonrezeptorstatus ist nunmehr auch die Information über die Expression des Onkoproteins HER-2/neu entscheidend für das Management von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Grundlage für diesen Durchbruch ist die Einführung einer neuen, immunologischen Therapieoption in Form des humanisierten, monoklonalen anti-HER-2/neu-Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®), der es dem behandelnden Onkologen erlaubt, den als ungünstig gewerteten Faktor HER-2/neu spezifisch zu antagonisieren (12;22). Auch in der adjuvanten Situation gilt HER-2/neu als Selektionsfaktor für eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie, was aber bislang noch nicht prospektiv überprüft wurde und noch nicht in die Konsensusempfehlungen der Fachgesellschaften Eingang fand (67-71). Für die Gabe von Tamoxifen, ja sogar hormonelle Therapieformen generell, wird sowohl für die adjuvante wie auch für die metastasierte Situation eine ungünstige Prädiktivität bei HER-2/neu-positiven Patientinnen angenommen (41;47;72-75).

Voraussetzung für eine gelungene Selektion der Patientinnen zugunsten einer dieser Therapieformen ist ein gut standardisierter, reliabler und valider Nachweis von HER-2/neu. Im allgemeinen wird HER-2/neu entweder als membrangebundenes Protein durch die Immunhistochemie (IHC) oder durch die Markierung des überamplifizierten Gens über die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen (16;17;76;77). Die Testung auf die durch proteolytische Prozesse von der Zellmembran abgeschnittene und in das Serum abgegebene, extrazelluläre Domäne von HER-2/neu (s-HER-2/neu) ist dagegen mit standardisierten Testverfahren noch wenig in klinischen Studien untersucht (78-80). Es war das Ziel der Analysen in dieser Habilitationsschrift, die Bedeutung von s-HER-2/neu als prognostischen und prädiktiven Faktor für das Mammakarzinom weiter abzugrenzen und seinen Stellenwert in der HER-2/neu-Diagnostik für die Selektion von Patientinnen zugunsten einer Herceptin-Therapie zu bestimmen. Dabei sollte s-HER-2/neu auch im Vergleich zu den Serummarkern s-EGFR, s-uPA und CA 27.29 untersucht werden.

Grenzwertbestimmungen der Serummarker

Ausgangspunkt für inhaltlich valide Aussagen zur prognostischen und prädiktiven Bedeutung von s-HER-2/neu und seine Abgrenzung gegenüber anderen Parametern waren verlässliche Grenzwertbestimmungen für alle untersuchten biochemischen Marker, vor allem aber für s-HER-2/neu. Insgesamt ließ sich mit der manuellen wie auch mit der automatisierten Methodik zur Messung des Serumspiegels von HER-2/neu ein oberer cut-off-Wert von 15 ng/ml ermitteln. Dies spricht einerseits für die gute Qualität der Tests und deren Ausführung im Labor, andererseits stützt diese Kongruenz die Reliabilität der quantitativen Nachweismethode von s-HER-2/neu sowie die Robustheit des Markers.

Cut-off-Werte müssen für jedes Labor separat etabliert und die Ergebnisse stets auf diesen lokal gültigen cut-off-Bereich bezogen werden. Nur so können Vergleiche zwischen den Laboreinrichtungen angestellt werden. Dadurch erklärt sich von selbst, daß die verschiedenen Forschergruppen geringfügig unterschiedliche obere Grenzwerte für s-HER-2/neu ermittelt haben. So hat die Hamburger Gruppe um PD Thomssen in ihren bisherigen Untersuchungen einen oberen cut-off-Wert von 12 ng/ml ermittelt (persönliche Mitteilung), während kooperative Gruppen in den USA mit einem oberen cut-off von 10,5 ng/ml arbeiteten (80). Die größte publizierte, multizentrische Untersuchung, an der auch unsere Studiengruppe beteiligt war, etablierte allerdings den von uns auch in der monozentrischen Analyse ermittelten cut-off-Wert von 15 ng/ml (40).

Entscheidend war bei allen publizierten Untersuchungen, daß s-HER-2/neu auf jeden Fall quantitativ verlässlich nachgewiesen werden kann. Auch der Vorgänger-Assay von Chiron Diagnostics, der in unseren anfänglichen Analysen noch mitgeführt wurde, war bereits so sensitiv, selbst niedrige Konzentrationen von s-HER-2/neu zu detektieren. Wir hatten für diesen Assay einen oberen cut-off-Wert von 15 U/ml entwickelt, andere Studiengruppen hatten bei ihren Grenzwertbestimmungen den oberen cut-off-Wert bei 20 U/ml oder 30 U/ml festgelegt (41;61). Unsere Studiengruppe ist bislang die einzige, die beide Testmethoden direkt miteinander verglich und praktisch eine 1:1-Übersetzbarkeit der Ergebnisse des Chiron-Assays von U/ml in den Oncogene-Assay in ng/ml darstellen konnte.

Es erscheint als wichtig, daß der Oncogene-Assay nicht mit dem Test identisch ist, der im Rahmen der Herceptin-Zulassungsstudien für begleitende Serumbestimmungen von HER-2/neu benutzt wurde. Dieser Test soll im folgenden als "serum clinical trial assay" (s-CTA) bezeichnet werden. Der Hauptunterschied zwischen dem s-CTA und dem Oncogene-Test liegt in dem Antikörper, der zur Bindung von s-HER-2/neu benutzt wird. Beim s-CTA wird der ursprüngliche, murine, noch nicht humanisierte Vorläufer von Herceptin 4D5 eingesetzt. Insgesamt zeichnet sich der s-CTA durch eine deutlich niedrigere Sensitivität im Vergleich zum Oncogene-Assay aus. Insofern sind die einzigen, in Vollversion publizierten Daten zu s-HER-2/neu aus der Herceptin-Monotherapiestudie mit großer Vorsicht zu betrachten (24). Eine Korrektur im Sinne eines Vergleiches des s-CTA mit dem Oncogene-Assay wurde erst kürzlich vorgestellt (81). Allerdings wurde nicht darauf eingegangen, warum der s-CTA kein s-HER-2/neu in Kontrollseren detektieren kann, oder in anderen Worten, warum die Testergebnisse in Kontrollseren den Wert 0 ergaben. Dies widerspricht nicht nur den Ergebnissen aller Studiengruppen, sondern auch der biologischen Rationale: Da HER-2/neu in epithelialen Organen bei gesunden Männern und Frauen exprimiert und in das Serum abgegeben wird, muß bei jedem Menschen bei ausreichender Testqualität s-HER-2/neu nachweisbar sein. Tabelle 33 zeigt eine Zusammenfassung der Unterschiede zwischen dem s-CTA- und dem Oncogene-Assay.

Tabelle 33: Vergleich von Testkriterien des s-CTA aus den Herceptin-Studien mit dem Oncogene-Assay (24;81)

	s-CTA	Oncogene
Detektion in Kontrollseren	keine Detektion in Kontrollseren	Detektion in Kontrollseren
Untere Detektionsgrenze	3,4 ng/ml	3,4 ng/ml
Obere Verdünnungsgrenze	keine Angabe	36 ng/ml
Oberer cut-off-Wert	keine Angabe	15 ng/ml
Median in Herceptin-Zulassungsstudien	10,6 ng/ml	41,6 ng/ml
Range in Herceptin-Zulassungsstudien	3,4-1880 ng/ml	3,4-9766,4 ng/ml

Sowohl für den manuellen Assay wie auch für die automatisierte Testversion konnte eine Unabhängigkeit des *in vitro*-Testergebnisses von s-HER2/neu von der Herceptin-Konzentration in der Probe nachgewiesen werden (40). Man geht von unterschiedlichen Bindungsstellen des ELISA-Testantikörpers und des therapeutischen Antikörpers an das zirkulierende Onkoproteinfragment aus. Somit dürfte auch unter Herceptin-Therapie eine objektive und reliable Testsituation bestehen.

Bestimmungen von s-EGFR sind in der Literatur selten und liegen zeitgleich zu unseren eigenen Untersuchungen erst in Abstract-Form vor (82-84). Der cut-off-Bereich, der von der Herstellerfirma erst kürzlich vorgestellt wurde, reicht von 45-78 ng/ml und ist unserem eigenständig etablierten cut-off-Bereich von 52-76 ng/ml sehr ähnlich (85). Entscheidend ist, daß auch von anderen Studiengruppen bei ca. einem Drittel aller Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren (u.a. Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Prostatakarzinom) ein erniedrigter s-EGFR-Spiegel nachgewiesen werden konnte.

uPA ist in Deutschland durch die Arbeiten von Harbeck et al. als prognostischer Faktor anerkannt (86;87). Es muß aber betont werden, daß diese Arbeiten mit den entsprechenden cut-off-Bestimmungen an Tumorphomogenaten durchgeführt wurden. Angaben zu den cut-off-Werten von s-uPA gibt es, ähnlich wie für s-EGFR, in der Literatur kaum. Lediglich ein Abstract liegt für s-uPA-Bestimmungen beim Pankreaskarzinom vor (88). In den mitgeführten Kontrollgruppen ergab sich ein oberer cut-off-Wert von 1940 pg/ml für Frauen und von 1740 pg/ml für Männer. In unseren Bestimmungen hatte sich ein oberer cut-off-Wert von 1830 pg/ml gezeigt und kann damit auch als bestätigt betrachtet werden.

Für den oberen cut-off-Wert von CA 27.29 liegen in der Literatur gute Daten vor, die zu dem gleichen Ergebnis von 30 U/ml kamen (44;89-91). Das aktuelle update der Empfehlungen der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Onkologie ASCO für den Einsatz von Tumormarkern beim Mammakarzinom räumt zwar ein, daß CA 27.29 eine sensitivere Bestimmungsmethode bzw. ein reliableres Antigen darstellt als CA 15-3, bleibt aber zurückhaltend und empfiehlt weitere klinische Studien, die eine frühere Entdeckung einer Progression durch den Einsatz von Tumormarkern nachweisen sollen.

Sensitivität, Prävalenz in Studien und Spezifität

Die Sensitivität von s-HER-2/neu ist in frühen Stadien der Erkrankung sehr gering und liegt für die Stadien I-III zwischen 0-15% (10;35;92). Für das Stadium IV der Erkrankung fanden wir bei 40% aller fernmetastasierten Patientinnen einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel. Andere Autoren berichten von einer Sensitivität von über 60% für die metastasierte Situation (14;15).

Unsere Analysen bei metastasierten Patientinnen zeigten einen statistisch signifikanten Bezug des HER-2/neu-Spiegels zur dominanten Lokalisation der Erkrankung (Viszera, Weichteile oder Knochen). Es fiel auf, daß Niedrigrisikolokalisationen wie Weichteile oder Knochen mit einem s-HER-2/neu-Spiegel um den oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml einhergingen, während die Patientinnen mit viszeraler Erkrankung einen vielfach erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel aufwiesen. Der Hauptmetastasierungsort erklärt neben dem üblichen bias durch kleine Fallzahlen wahrscheinlich die Diskrepanz der Angaben aus den wenigen klinischen Studien zu s-HER-2/neu. Während in der größten, publizierten Untersuchung an 719 Patientinnen unter Hormontherapien nur bei 30% ein erhöhter s-HER-2/neu-Spiegel festgestellt wurde, war in einer Studie der Cancer and Leukemia Group B (CALGB) der Anteil bei 37% bei einer Gesamtzahl von 242 Patientinnen, von denen aber nur knapp die Hälfte unter Hormontherapie standen (79;80). In einer Phase II-Studie mit Doxorubicin und Paclitaxel beim metastasierten Mammakarzinom lag der Anteil der s-HER-2/neu-positiven Patientinnen bei 41%, wobei eingeschränkt werden muß, daß hier ein anderer, nicht von der FDA zugelassener Test für die Serumbestimmung von HER-2/neu eingesetzt worden war (93). In der ersten publizierten Studie zur Kombination von Docetaxel und Herceptin lag der Anteil an s-HER-2/neu-positiven Patientinnen bei 70%, was nicht überrascht, da nur HER-2/neu-positive Patientinnen für die Studie qualifizierten (78). Man muß also davon ausgehen, daß der Prozentsatz von s-HER-2/neu-positiven Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom stark von der Zusammensetzung des Kollektivs abhängt: Je ungünstiger die Lokalisation der Metastasierung, desto größer ist im allgemeinen auch die Tumorlast und der Anteil der HER-2/neu-gewebepositiven Patientinnen. Damit schwankt die Serumpositivität für HER-2/neu zwischen 30% und 70%.

Die Spezifität von s-HER-2/neu gegenüber gesunden Frauen oder Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen lag in unserer Analyse bei 97%, was für einen Serumtest als sehr gut eingestuft werden muß. Generell hatten wir mit diesem Ergebnis gerechnet, da HER-2/neu als Onkogen nicht zu unspezifischen Erhöhungen führen dürfte, wie wir dies von den klassischen Massentumormarkern kennen.

Prognostische Bedeutung und regulative Mechanismen

Die ungünstige prognostische Bedeutung eines erhöhten s-HER-2/neu-Spiegels vor und nach einer adjuvanten Chemotherapie ist in klinischen Studien erwiesen und wurde hierbei ähnlich stark wie der Lymphknotenstatus gewertet (94-96). Hierbei muß s-HER-2/neu als Surrogatmarker für die Mikrometastasierung betrachtet werden. Die Analysen zeigten eine statistisch signifikante Korrelation des baseline-s-HER2/neu-Spiegels mit dem krankheitsfreien Überleben. In der Table-Studie war das initiale Ziel gewesen, diese Daten in einer prospektiv randomisierten Studie im Vergleich zu einer CMF-Chemotherapie mit dem GnRH-Analogon Leuprorelin zu bestätigen. Aufgrund der noch sehr geringen Anzahl an Rezidiven bei relativ kurzer Nachbeobachtungszeit war dies noch nicht möglich. Als unerwartetes Ergebnis fanden wir anhand der Serien aus der Table-Studie aber Hinweise auf die *in vivo*-Regulation von HER-2/neu in Abhängigkeit vom hormonellen Milieu. So konnten wir erstmals über die longitudinale Hochregulation von s-HER-2/neu während der therapeutischen Induktion der Menopause berichten. Wir hatten keinen Anhalt, daß dieser Anstieg von s-HER-2/neu aus residuellen Tumorzellen oder einem Rezidiv der Tumorerkrankung stammt, sondern sich vielmehr aus epithelialen Organen wie Blase, Pankreas oder Magen rekrutiert (97;98). Diese These wurde durch die bereits erwähnte geringe Anzahl an Rezidiven (20/133 Patientinnen) und das stabile CA 27.29-Niveau gestützt.

Der ausgeprägteste relative Anstieg von s-HER-2/neu fand unabhängig vom Therapiearm zwischen baseline und Monat 3 statt und war damit zum Abfall des Östradiolspiegels gegenläufig. Diese Ergebnisse sind mit anderen Untersuchungen konsistent, welche Schwankungen der HER-2/neu-Expression in Abhängigkeit von (zyklischen) hormonellen

Einflüssen nachweisen konnten. In ER-positiven Mammakarzinomzelllinien werden der HER-2/neu-Protein- und mRNA-Gehalt jeweils negativ bzw. positiv durch Östrogene bzw. Antiöstrogene kontrolliert (53;93;99). Dabei scheint die Intensität der wechselseitigen Inhibition zwischen dem Heregulin/HER-2 und dem Östrogen/ER-System von der relativen ER- und HER-2/neu-Expression abzuhängen (100). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß sogenannte AP-2-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der HER-2/neu-Genexpression durch Östradiol beteiligt sind (45). Zudem wurde ein Modell aufgestellt, gemäß dem nicht an die DNS anbindende Faktoren wie SRC-1 die Inhibition durch Östrogene am Intron 1 des HER-2/neu-Promoters unterstützen (101). Laut diesem Modell bindet SRC-1 bei Östrogenexposition bevorzugt an den Östrogenrezeptor, worauf es zerfällt und seine unterstützende Wirkung am HER-2/neu-Promoter verliert. Unter Östrogenentzug dissoziiert der Kofaktor aber vom Östrogenrezeptor und kann dann den HER-2/neu-Promoter stimulieren.

Longitudinale Untersuchungen im ähnlichen Ansatz wie in der Zellkultur sind *in vivo* nur mit der Serummessung des zirkulierenden Antigens von HER-2/neu möglich. So konnte gezeigt werden, daß die s-HER-2/neu-Konzentrationen prämenopausaler Frauen statistisch signifikant niedriger sind als die s-HER-2/neu-Spiegel postmenopausaler Frauen (102). Meden et al. konnten ähnliche Ergebnisse für gesunde, prämenopausale Frauen unter hormoneller Kontrazeption und für postmenopausale Frauen unter Hormonersatztherapie erbringen (103;104). Letztere boten unter Hormonsubstitution einen signifikanten Abfall der s-HER-2/neu-Spiegel zurück auf das Niveau prämenopausaler Frauen. Vergleichbar wurde der s-HER-2/neu-Spiegel prämenopausaler Frauen durch hormonelle Kontrazeptionsmaßnahmen weiter supprimiert. All diese Studien verglichen unterschiedliche Patientinnengruppen mit relativ geringen Fallzahlen und stehen damit im Gegensatz zu unserer eigenen Untersuchung, in der das gleiche Kollektiv direkt während der Induktion der Menopause beobachtet wurde.

Die klinische Bedeutung dieser hormonellen Regulation von HER-2/neu besteht in der Möglichkeit des bias von HER-2/neu-Gewebenachweisen bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen. Die Operation des Primärtumors während unterschiedlicher Phasen des Menstruationszyklus könnte zu falschen HER-2/neu-Ergebnissen führen, was

seinerseits eine verfälschte Selektion von Patientinnen für spezifische, anti-HER-2/neu-gerichtete Therapien mit sich bringen könnte. Eine retrospektive Analyse an 198 Mammakarzinomen durch Balsari et al. konnte tatsächlich zeigen, daß der Anteil an HER-2/neu-positiven und ER-positiven Primärtumoren statistisch signifikant auf 20% anstieg, wenn die Operation in der Follikelphase des Menstruationszyklus stattfand. Der Anteil der HER-2/neu - und ER-positiven Karzinome in der Lutealphase lag dagegen nur bei 8% (56). Im Rahmen dieser Studie wurden auch Biopsien und Operationspräparate untersucht, die während verschiedener Zyklusphasen gewonnen worden waren und auch unterschiedliche Ergebnisse in der HER-2/neu-Expression erbrachten.

Es ist schwierig, dieses Wissen um die Regulation der HER-2/neu-Expression während des Menstruationszyklus in den klinischen Alltag oder zumindest in die Studienlandschaft zu integrieren. Dies gilt umso mehr, als in der Balsari-Studie gezeigt werden konnte, daß die HER-2/neu-Überexpression nicht immer auch mit einer Genamplifikation assoziiert war (56). Damit kann das Problem nicht durch den bevorzugten Einsatz der FISH im Vergleich zur IHC gelöst werden. Ein praktikabler Ansatz wäre die komplementäre Messung von s-HER-2/neu zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung zusätzlich zum HER-2/neu-Gewebeergebnis aus dem Primärtumor. Unsere Analysen haben gezeigt, daß eine lineare Korrelation zwischen dem s-HER-2/neu-Spiegel zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung und der HER-2/neu-Proteinexpression bzw. HER-2/neu-Genamplifikation im Primärtumor besteht. Somit kann der s-HER-2/neu-Status für die Mehrzahl der Patientinnen eine Bestätigung und damit mehr Sicherheit der HER-2/neu-Gesamtdiagnostik liefern.

Die Daten zur Regulation von HER-2/neu während des Menstruationszyklus bringen den Bezug zwischen Operationszeitpunkt und Prognose wieder in die Diskussion. Einige Untersuchungen berichten, daß die Operation des Primärtumors während der Follikelphase im Vergleich zur Lutealphase mit einem ungünstigeren outcome verknüpft ist (105-107). Es gibt eine Vielzahl von Erklärungsversuchen, warum die Primäroperation während der Follikelphase Jahre später zu früheren und mehr Rezidiven führen sollte. Diskutiert wird eine Hochregulation von EGFR und/oder HER-2/neu, eine Begünstigung der Neoangiogenese durch einen erhöhten Spiegel des vascular endothelial growth factors (VEGF), Beeinträchtigungen der zellulären und humoralen Immunität oder auch eine

Inhibition der Apoptose (108). Es ist durchaus möglich, daß humorale Begleitphänomene der Wundheilung abhängig von der hormonellen Gesamtsituation unterschiedlich auf okkulte Tumorzellen Einfluß nehmen. Die Primäroperation zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Menstruationszyklus könnte zu einer qualitativ oder quantitativ unterschiedlichen Fraktion zirkulierender Zellen führen, die dann auf mehr oder weniger günstige Konstellationen für die Evasion aus dem Gefäßsystem stoßen. Man sollte aus diesen Erkenntnissen den Schluß ziehen, daß bei prämenopausalen Patientinnen beim Einschluß in prospektive klinische Studien auf jeden Fall der Zeitpunkt der Operation während des Menstruationszyklus dokumentiert werden sollte (109).

HER-2/neu und hormonelle Therapieformen im allgemeinen

Retrospektive Analysen klinischer Studien haben zu kontroversen Ergebnissen in bezug auf die prädiktive Bedeutung von HER-2/neu für unterschiedliche endokrine Therapieformen geführt. So wird diskutiert, daß ER-positive und HER-2/neu-positive Tumoren mit geringerer Wahrscheinlichkeit auf Tamoxifen ansprechen, wobei es auch gegensätzliche Ergebnisse gibt (41;47;62;73;74). In einem Transfektionsmodell konnte *in vitro* die Konversion von MCF-7-Zellen in einen HER-2/neu-überexprimierenden Phänotyp gezeigt werden, der dann ein Östrogen-unabhängiges Wachstum zeigte und damit auch nicht mehr sensibel auf Tamoxifen war (110).

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wurden erhebliche Unterschiede in den Responderaten zwischen neoadjuvant verabreichtem Letrozol im Vergleich zu Tamoxifen bei EGFR- und gleichzeitig HER-2/neu-positiven Tumoren festgestellt (88% versus 21%, $p=0,0004$). Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied in der Responderate bei EGFR- und HER-2/neu-negativen Tumoren zwischen den beiden Behandlungsformen (54% und 42%, $p=0,1078$) (111). Diese Ergebnisse schienen zunächst widersprüchlich zu dem Bericht von Lipton et al. zu sein, der für Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die in Studien zum Vergleich von Fadrozol oder Letrozol versus Megestrolacetat eingeschlossen waren, eine statistisch signifikant niedrigere Responderate

und ein kürzeres progressionsfreies Überleben nachgewiesen hatte, wenn sie einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel aufwiesen (79;112).

Nunmehr wurden diese Ergebnisse ergänzt durch eine Erstlinientherapiestudie des metastasierten Mammakarzinoms, bei der Letrozol mit Tamoxifen verglichen wurde (113). Als Gesamtstudienresultat zeigte sich, daß Patientinnen mit normalem s-HER-2/neu-Spiegel (n=398) ein besseres Therapieergebnis im Sinne einer höheren objektiven Remissionsrate und einer längeren Zeit bis zur Progression unter Letrozol im Vergleich zu Tamoxifen hatten (alle p-Werte für alle Endpunkte <0,03). Für Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel (n=164) gab es einen Trend zugunsten eines besseren Outcomes im Letrozol-Arm (p=0,139). Es sollte berücksichtigt werden, daß sogar in sehr großen Studien die statistische Power für die Untergruppe mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel immer abfällt, da sie im allgemeinen die kleinere Gruppe ist. Damit ist nicht ausgeschlossen, daß s-HER-2/neu-positive Patientinnen tatsächlich von Letrozol besonders profitieren. Diese Subgruppenanalyse unterstützt durchaus das Gesamtergebnis der Studie in dem Sinne, daß der Aromatasehemmer Letrozol (ähnlich wie andere Aromatasehemmer) unabhängig vom HER-2/neu-Status dem Tamoxifen in der Erstlinienhormontherapie des metastasierten Mammakarzinoms überlegen ist und nunmehr für diese Indikation von den Gesundheitsbehörden zugelassen wurde.

Die Ergebnisse zur prädiktiven Bedeutung von s-HER-2/neu für hormonelle Therapieformen in der metastasierten Situation sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: s-HER-2/neu-Spiegel und outcome von Hormontherapien im Stadium IV

Autor (Referenz)	Medikation	outcome	s-HER-2/neu erhöht	s-HER-2/neu normal	p
Leitzel (41)	Fadrozol versus Megestrolacetat (n=300)	Clinical benefit (CR+PR+SD)	20,7%	40,9%	0,004
		Dauer des Ansprechens	11,6 Monate	15,5 Monate	0,04
		Überleben	64,7 Monate	107,7 Monate	0,0001
Yamauchi (74)	Droloxifen in drei Dosierungen (n=94)	Responserate	9%	56%	0,0001
		Zeit bis Progression	verkürzt	verlängert	0,0003
		Überleben	verkürzt	verlängert	0,003
Lipton (79)	Fadrozol/Letrozol versus Megestrolacetat (n=719)	Clinical benefit (CR+PR+SD)	23%	45%	<0,0001
		Dauer des Ansprechens	11,7 Monate	17,4 Monate	<0,0001
		Zeit bis Progression	90 Tage	180 Tage	<0,0001
		Überleben	17,2 Monate	29,6 Monate	<0,0001
Lipton (113)	Letrozol versus Tamoxifen (n=398)	Clinical benefit (CR+PR+SD)	29%	50%	0,0001
		Zeit bis Progression	4,7 Monate	9,5 Monate	0,0001

HER-2/neu und Chemotherapie: Anthrazykline und Taxane

Die Diskussion über die prädiktive Bedeutung der HER-2/neu-Serumpositivität bei hormonellen Therapieformen sowie die eigenen Untersuchungen zu wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel und zu Chemotherapie im allgemeinen legen die Diskussion nahe, ob auch die Effektivität systemischer Chemotherapien vom HER-2/neu-Status abhängt. Die Analysen, die auf ein schlechteres Ergebnis einer CMF-Chemotherapie sowie den Nutzen einer hochdosierten, anthrazyklinhaltigen Chemotherapie bei HER-2/neu-positiven Patientinnen hinweisen, berufen sich überwiegend auf die HER-2/neu-Positivität mittels Immunhistochemie (70-72;114). In bezug auf die Kombination von Anthrazyklin und Taxan zeigten Gianni et al. kürzlich eine signifikant höhere Rate an kompletten Remissionen auf eine intensive Chemotherapie mit Doxorubicin (60 mg/m^2) und Paclitaxel (200 mg/m^2) bei HER-2/neu positiven Patientinnen (115). Die Diagnose der HER-2/neu-Positivität wurde hierbei mittels FISH an Feinnadelaspiraten des Primärtumors oder von Fernmetastasen gestellt. Es scheint somit, daß insbesondere die Gruppe der HER-2/neu-positiven Patientinnen von einer intensivierten Therapie mit dieser Kombination profitiert.

Zu s-HER-2/neu liegen Daten aus einer großen ECOG-Studie vor (ECOG 1193), welche die Kombination von Doxorubicin und Paclitaxel gegen eine sequentielle Therapie mit den beiden Medikamenten sowie gegen eine Monotherapie mit Paclitaxel in der metastasierten Situation verglich (114). Während auch hier der baseline-s-HER-2/neu-Spiegel mit dem Gesamtüberleben signifikant korrelierte (30,2 Monate versus 17,2 Monate für s-HER-2/neu-negative Patientinnen versus s-HER-2/neu-positive Patientinnen), ergab sich kein Zusammenhang zwischen der s-HER-2/neu-Positivität und der Responserate im allgemeinen wie auch differenziert nach dem Untersuchungsarm.

Ähnliche Daten wurden auch in unserer Studie zu wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel gewonnen. Wir fanden eine statistisch signifikant kürzere Responsedauer für Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu-Spiegel bei Therapiebeginn. Auch das progressionsfreie Überleben war tendenziell kürzer. Unseres Wissens nach ist dies die erste Analyse, die aufzeigen konnte, daß das progressionsfreie Intervall mit ansteigenden s-HER-2/neu-Konzentrationen kürzer wird. Ab einem s-HER-2/neu-Spiegel von 22 ng/ml wurde der p-

Wert für das verkürzte progressionsfreie Intervall immer kleiner, was auf biologische Subgruppen in der Gruppe der s-HER-2/neu-positiven Patientinnen hinweist, die der HER-2/neu-Gewebeuntersuchung mit ihrer semiquantitativen Auswertung notgedrungen entgehen.

Ähnlich wie Stender et al. fanden wir keinen Unterschied in der Remissionsrate zwischen den s-HER-2/neu-positiven und den s-HER-2/neu-negativen Patientinnen (114). In einem ähnlichen Studienansatz konnten Colomer et al. einen Bezug zwischen einem hohen s-HER-2/neu-Spiegel und einer geringen Wahrscheinlichkeit der Remissionsinduktion durch die Kombination von Doxorubicin plus Paclitaxel als *Erstlinientherapie* des metastasierten Mammakarzinoms (n=58) nachweisen (93). Auch das progressionsfreie Überleben war für s-HER-2/neu-positive Patientinnen kürzer. Während also unsere Studienergebnisse mit denen von Colomer et al. im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben übereinstimmen, könnte der fehlende Bezug zum objektiven Ansprechen in unserer Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel auf die unterschiedliche Fallzahl und auf die spätere Chemotherapielinie zurückzuführen sein. Je mehr Vortherapien stattfinden, desto geringer ist im allgemeinen die Anzahl der responder, was wiederum die statistische power reduziert.

Insgesamt kann man also davon ausgehen, daß beim metastasierten Mammakarzinom trotz HER-2/neu-Überexpression eine gewisse Sensitivität gegenüber Taxanen und Anthrazyklinen besteht, welche einen noch ungünstigeren Verlauf der Erkrankung etwas abbremsen lässt (60;116). Dafür sprechen auch präklinische Berichte über eine kürzere Remissionsdauer bzw. schnelleres, erneutes Wachstum von HER-2/neu-überexprimierenden xenografts im Vergleich zu Kontroll-xenografts, was eher auf einen höheren Proliferationsindex als eine primäre Resistenz gegenüber Paclitaxel hinweist (117). Die Kombination aus Paclitaxel und einem Anthrazyklin könnte ein geschickter Weg sein, die ungünstige Konstellation der HER-2/neu-Positivität auszugleichen. In ersten Studien zum metastasierten Mammakarzinom konnte sogar eine höhere Remissionsrate und ein längeres progressionsfreies Intervall von HER-2/neu-positiven Patientinnen im Vergleich zu HER-2/neu-negativen Patientinnen erzielt werden (118).

Generell ist die Aktivität von wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel als Monotherapie in unserem erheblich vorbehandelten Kollektiv sehr gut mit einer objektiven Remissionsrate von 40% und einem mittleren progressionsfreien Intervall von 39 Wochen. In ähnlichen Studien wurden Remissionsraten bis zu 53% und eine Responsedauer von 7,5 Monaten, allerdings in einem weniger vorbehandelten Kollektiv mit n=30, angegeben (119). In unserer Studie dauerten die Remissionen sogar noch länger an mit einer mittleren Dauer von 10 Monaten. In einer Studie mit einer sehr hohen Zielfallzahl von 200 Patientinnen zeigte eine Zwischenanalyse über die ersten 130 Patientinnen eine Responserate von 24% trotz mehrfacher Vorbehandlung inklusive Hochdosischemotherapie (120).

Die hohe Wirksamkeit von dosisintensiviertem, wöchentlich fraktionierten Paclitaxel ist die Grundlage für die Kombination mit anderen, bevorzugt wöchentlich verabreichten Zytostatika (Gemcitabin, Vinorelbin) und mit Herceptin als therapeutischem Antikörper. Die Kombination aus wöchentlichem Paclitaxel plus Herceptin führte zu Remissionsraten von 41-46% bei HER-2/neu-negativen Patientinnen (je nach Antikörper für die immunhistochemische HER-2/neu-Bestimmung) und einer Remissionsrate von 67-81% bei HER-2/neu-Überexpression (121;122). Diese vielversprechenden Ergebnisse mündeten in das CALGB9840-Programm, das sogar für HER-2/neu-negative Patientinnen die Therapiearme mit wöchentlichem Paclitaxel mit oder ohne Herceptin vorsieht und diese mit der Kombination aus dreiwöchentlichem Paclitaxel plus Herceptin und einem Kontrollarm aus dreiwöchentlichem Paclitaxel als Monotherapie vergleicht. Die HER-2/neu-positiven Patientinnen erhalten somit wöchentlich Herceptin in Kombination mit entweder wöchentlichem oder dreiwöchentlichem Paclitaxel.

Prädiktive Bedeutung von s-HER-2/neu und anderen Serummarkern für Chemotherapie im allgemeinen

Durch Vergrößerung der Fallzahl konnten wir im Anschluß an die Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel an einem unselektierten Patientinnengut im Sinne eines „proof of concept“ den prädiktiven Einfluß eines erhöhten s-HER-2/neu-Spiegels in einer multivarianten Analyse nachweisen. Neben s-HER-2/neu hatten nur die Zahl der

betroffenen Organe sowie der Remissionsstatus einen statistisch signifikanten Einfluß auf das progressionsfreie Überleben. Für s-EGFR (\leq / $>$ 50 ng/ml), s-uPA (\leq / $>$ 1800 pg/ml) und CA 27.29 (\leq / $>$ 30 U/ml) lagen die Kaplan-Meier-Kurven übereinander oder eng beieinander. Wir konnten nebenbefundlich zeigen, daß die s-EGFR-Spiegel bei postmenopausalen Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom statistisch signifikant niedriger waren als bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen (56,5 ng/ml im Vergleich zu 64,7 ng/ml). Dabei fiel die s-EGFR-Konzentration mit zunehmendem Alter geringfügig ab. Vergleichbare Beobachtungen in der Literatur gibt es nicht. Dies gilt auch für die Erkenntnis, daß HER-2/neu-negative Patientinnen (FISH) statistisch signifikant seltener erniedrigte EGFR-Spiegel \leq 50 ng/ml aufwiesen.

Für s-EGFR gibt es eine ähnlich konzipierte Untersuchung wie unsere multivariate Analyse mit verschiedenen Serumparametern, die allerdings zu einem anderen Ergebnis kam: Marx et al. fanden in einer vorläufigen Analyse bei den Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom aus den oben genannten Hormontherapiestudien mit Fadrozol versus Megestrolacetat ein statistisch signifikant kürzeres progressionsfreies Intervall für die Subgruppe mit erniedrigtem s-EGFR-Spiegel (41;123). Der p-Wert für diesen Teilaspekt lag bei 0,04 und bezog sich auf den frühen Abschnitt der Kaplan-Meier-Kurven, die sich allerdings nach anfänglicher Trennung im weiteren Verlauf wieder trafen. Es ist abzuwarten, ob in der publizierten Endversion der Analyse die statistische Aufarbeitung und damit die Schlußfolgerungen (Patientinnen mit einem erniedrigten s-EGFR-Spiegel haben ein schlechteres outcome als Patientinnen mit einem normalen s-EGFR-Spiegel) gleich bleiben. Auch in der Diskussion mit dieser Arbeitsgruppe gab es keinen Erklärungsvorschlag, warum ein Drittel der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom einen erniedrigten s-EGFR-Spiegel zeigt und wie dies in die aktuellen Konzepte der Kombination von anti-EGFR- und anti-HER-2/neu-spezifischen Therapien zu integrieren ist (124-127).

Die ungünstige Bedeutung von uPA ist für das Mammakarzinom in den frühen Stadien anerkannt (86;87;128). Daten zu s-uPA mit standardisiertem Test liegen allerdings nicht vor. Es muß hoch anerkannt werden, daß uPA und PAI-1 bislang als einzige Gewebemarker im Rahmen von prospektiv randomisierten Studien inklusive Entscheidung

über die adjuvante Therapieform gemäß dem biochemischen Testergebnis mit Unterstützung der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) geprüft wurden. Dies entspricht dem Wunsch nicht nur einer individualisierten Therapie, sondern der bestmöglichen Sequenz der individualisierten Diagnostik mit konsekutiver, spezifischer Behandlung.

In unseren Ergebnissen war CA 27.29 zwar hervorragend zur Tumorlast und zur dominanten Lokalisation der Erkrankung assoziiert, hatte allerdings keine prädiktive Bedeutung in bezug auf Remissionsrate oder progressionsfreies Überleben. Die Datenlage hierzu ist nicht eindeutig, was die Wertung von Tumormarkern beim Mammakarzinom durch das Konsensuspanel der American Society of Clinical Oncology verständlich macht (129). Während die prognostische Bedeutung eines erhöhten CA 15-3-Spiegels bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms oder bei Einleitung einer adjuvanten Therapie gesichert ist, bleibt der Einfluß auf das Überleben nach dem Eintreten einer Fernmetastasierung unklar (130;131). Ali et al. fanden keinen Einfluß von CA 27.29 mehr auf die Responserate, wenn zuvor nach dem s-HER-2/neu-Spiegel adjustiert worden war (132). Gleichzeitig blieb aber ein ungünstiger Einfluß eines hohen CA 27.29-Spiegels auf das Gesamtüberleben vorhanden. Dies ist erstaunlich, ist doch die Remissionsinduktion eine wichtige Voraussetzung für die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und damit auch des Gesamtüberlebens.

CA 27.29 war in unseren Untersuchungen mit Abstand der beste Serumparameter zum Monitoring des metastasierten Mammakarzinoms. Es zeigte die ausgeprägtesten relativen Unterschiede von baseline über den Beobachtungszeitraum hinweg und konnte hierbei sogar zwischen den einzelnen Remissionsgruppen mit CR, PR oder SD unterscheiden. Es war bemerkenswert, daß sich die Gruppe SD nicht von der Gruppe PD unterscheiden ließ. Dies war mit keinem der untersuchten Serumparameter möglich. Da zwei Drittel aller s-EGFR-Konzentrationen innerhalb des cut-off-Bereiches lagen und keine Assoziation zur Tumormasse bestand, war s-EGFR zur Verlaufsbeurteilung des metastasierten Mammakarzinoms nicht hilfreich. s-uPA und s-HER-2/neu eignen sich gut zum Monitoring, stehen aber hinter CA 27.29 zurück. Dies bedeutet nicht, daß die Verlaufsbeurteilung mit CA 27.29 das Monitoring durch s-HER-2/neu vollständig ersetzen

kann. Unsere Ergebnisse zu den relativen Effekten bei Meßwiederholungen nach Brunner zeigten für s-HER-2/neu zum Teil steilere Abfälle als für CA 27.29. Damit kann früher als gewohnt eine Information über das Ansprechen gewonnen werden. In dieser Analyse konnten sogenannte „tumormarkernegative“ Patientinnen aufgrund des heterogenen Kollektivs und der für weitere Aufteilungen zu kleinen Fallzahl nicht berücksichtigt werden. Es werden aber bei ca. 20-30% aller Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom erhöhte s-HER-2/neu-Spiegel bei normalen CA 27.29-Konzentrationen beobachtet. Diese Frauen können biochemisch durch CA 27.29 überhaupt nicht beobachtet werden. Hier können Marker mit Bezug zur Tumormasse wie s-uPA und s-HER-2/neu eine Lücke schließen.

Monitoring durch s-HER-2/neu unter Herceptin-Therapie

Das Monitoring durch s-HER-2/neu ist in klinischen Studien mit unterschiedlichen Chemotherapieschemata in der Kombination mit Herceptin untersucht worden. Pegram et al. zeigten in einer Phase II-Studie mit Cisplatin plus Herceptin, daß Patientinnen mit stabiler Erkrankung oder Ansprechen auf die Behandlung einen statistisch signifikanten Abfall von s-HER-2/neu entwickeln (23). Ähnlich wie auch in unserer Analyse konnten auch sie keinen Unterschied im Abfall von s-HER-2/neu zwischen Patientinnen mit SD und Patientinnen mit Remission beobachten, da auch Frauen mit stabiler Erkrankung vereinzelt einen Abfall von s-HER-2/neu entwickelten. Dies ist nicht erstaunlich, da Herceptin den shedding-Prozeß an der extrazellulären Domäne von HER-2/neu durch die Inhibition von Metallomatrixproteasen reduzieren kann (7;8).

In einer Zulassungsstudie von Herceptin als Monotherapie für vorbehandelte Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom konnten keine Veränderungen von s-HER-2/neu im Therapieverlauf und in Relation zum Remissionsstatus festgestellt werden (24). Der Hauptgrund für dieses Ergebnis dürfte der Einsatz des unstandardisierten sCTA-Assays für die s-HER-2/neu-Messung sein. Ein oberer cut-off-Wert wurde nicht angegeben und fast 40% der s-HER-2/neu-Ergebnisse lagen unterhalb der unteren Nachweisgrenze. Die Eigenschaften dieser Testmethode waren zu Diskussionsbeginn in Tabelle 33 dargestellt

worden. Trotz dieser erheblichen Einschränkungen lassen sich aus dieser Untersuchung einige wichtige Aspekte herauslesen: Der s-HER-2/neu-Spiegel korreliert signifikant mit dem semiquantitativen HER-2/neu-Score aus der Immunhistochemie. Patientinnen mit einem IHC-Score von +3 zeigen im Mittel einen 4,7-fach höheren s-HER-2/neu-Spiegel als Patientinnen mit einem IHC-Score von +2. Zudem findet sich unter allen HER-2/neu-positiven Patientinnen eine kleine Gruppe von 6% mit einem extrem hohen s-HER-2/neu-Spiegel. Diese Patientinnen zeigen im allgemeinen eine äußerst schlechte Prognose bei kaum beeinflussbarer Grunderkrankung.

In bezug auf die prädiktive Bedeutung des baseline-Spiegels von s-HER-2/neu und das Monitoring blieben 2 wichtige Aspekte zu diskutieren: Spielt die Höhe von s-HER-2/neu jenseits des oberen cut-off-Wertes von 15 ng/ml eine Rolle für das Ansprechen auf eine Herceptin-Therapie? Wie ausgeprägt muß s-HER-2/neu in welchem Zeitraum abfallen, damit die Patientin mit großer Sicherheit einen Nutzen von der Behandlung hat? Für Chemotherapie ohne Herceptin war oberhalb einer Konzentration von 22 ng/ml die stets schlechtere Prädiktivität mit ansteigendem s-HER-2/neu in der Studie mit wöchentlich fraktioniertem Paclitaxel gezeigt worden. In der erst in Abstract-Form publizierten Analyse von Wong et al. zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend für ein ungünstiges Therapieergebnis von Patientinnen mit einer hohen s-HER-2/neu-Konzentration (81). Esteva et al. sind die ersten Autoren, die unter Herceptin-Therapie von einem besseren Ansprechen von s-HER-2/neu-positiven Patientinnen mit einer Responserate von 76% im Vergleich zu 33% bei s-HER-2/neu-negativen Patientinnen ($p=0,04$) sprechen (78). Daten zum progressionsfreien Überleben in Relation zum HER-2/neu-Serumstatus wurden in der Vollpublikation nicht angegeben. Bei einer Patientinnenanzahl von $n=30$ für die Gesamtstudie kann dieses Ergebnis dem üblichen bias der kleinen Fallzahl in Phase II-Studien unterliegen. Würde dieses Ergebnis bestätigt werden, wäre dies ein weiterer Hinweis darauf, daß Herceptin die Biologie des HER-2/neu-positiven Mammakarzinoms ändern kann. Wichtig ist, daß die Autoren darauf hinweisen, daß 75% der Patientinnen mit objektiver response auf die Kombination aus Docetaxel und Herceptin einen Abfall der s-HER-2/neu-Konzentration unter den oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml aufwiesen. Dies entspricht auch unseren Daten aus der deutschen Herceptin-Studie, die im Anhang unter Projekt 2 beschrieben ist. Auch in dieser Analyse hatten fast alle Patientinnen mit

objektiver Remission oder stabiler Erkrankung über mehr als 6 Monate einen Abfall von s-HER-2/neu unter 15 ng/ml. Auf ausdrückliche Bitte der Sponsoren dieser Studie werden die Ergebnisse vor der finalen Publikation in einem peer-gereviewten Journal nicht ausführlicher dargestellt.

Es gibt nur eine weitere Studiengruppe, die sich mit dem relativen, zeitlichen Abfall von s-HER-2/neu unter Herceptin und seiner Korrelation zum therapeutischen Ansprechen beschäftigte. Kostler et al. zeigten, daß die Höhe des s-HER-2/neu-baseline-Spiegels bei HER-2/neu-positiven Patientinnen nicht mit der objektiven Remission auf die Therapie assoziiert ist (133). Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu der oben zitierten Arbeit von Esteva (Patientinnen mit hohem s-HER-2/neu-Spiegel sprechen besonders gut an), aber auch zu den eigenen Ergebnissen ohne Herceptin-Begleitbehandlung (Patientinnen unter Chemotherapie mit hohem s-HER-2/neu-Spiegel sprechen besonders schlecht an) (78). Allerdings fanden die Kollegen der Wiener Arbeitsgruppe um Kostler heraus, daß der relative Abfall innerhalb der ersten zwei Wochen nach Einleitung der Herceptin-Therapie den Therapieerfolg schon vorhersagt. Dabei wird nicht angegeben, wie viel dieser relative Abfall der s-HER-2/neu-Konzentration zur Woche 2 betrug. Unsere eigenen Untersuchungen an Herceptin-Patientinnen konnten in der Woche 2 noch keinen Bezug zwischen relativem Abfall der s-HER-2/neu-Konzentration und Ansprechen auf die Therapie feststellen. In der Woche 4 fand sich diese Assoziation aber mit statistischer Signifikanz. Der s-HER-2/neu-Spiegel war dabei mindestens auf das 65%-Niveau im Vergleich zu Therapiebeginn abgefallen.

Ausbildung von Komplexen zwischen s-HER-2/neu und Herceptin

Eine potentiell erhebliche klinische Bedeutung von s-HER-2/neu wurde in dieser Habilitationsschrift nur am Rande angedeutet (*in vitro*-Messungen von s-HER-2/neu bei steigenden Herceptin-Konzentrationen in der Probe), soll aber kurz diskutiert werden. s-HER-2/neu beeinflusst laut den pharmakokinetischen Analysen der frühen Phase II-Studien den therapeutischen Wirkspiegel von Herceptin (23;43). Dabei scheint die steady-state-Konzentration von Herceptin mit dem Spiegel des zirkulierenden, solublen Antigens von

HER-2/neu abzufallen. Insbesondere bei Patientinnen mit einem s-HER-2/neu-Spiegel >300-500 ng/ml dürfte es zu einer relevanten Komplexbildung von s-HER-2/neu mit dem therapeutischen Antikörper kommen, so daß nicht eindeutig sicher ist, ob eine therapeutische steady-state-Antikörperkonzentration in der Blutbahn erreicht wird. Eine deutlich verkürzte Halbwertszeit von Herceptin wurde bei Patientinnen mit hoher s-HER-2/neu-Konzentration nachgewiesen. Neben diesen *in vivo*-Daten wurde die Komplexbildung von Herceptin und solublen HER-2/neu mit nachfolgender Aufhebung der Proliferationshemmung durch Herceptin auch in Zellkultur demonstriert (134).

Konkordanzanalyse verschiedener Methoden der HER-2/neu-Bestimmung

Es verbleibt für diese Habilitationsschrift, die “immunoconfusion” um den HER-2/neu-Nachweis am Tumorgewebe zu beleuchten und zu hinterfragen, ob die Serumbestimmung von HER-2/neu komplementär zu den Gewebenachweisen mehr Sicherheit in die Gesamtdiagnostik von HER-2/neu bringen kann. Die Ergebnisse unserer Konkordanzanalyse zusammen mit den Angaben aus der Literatur zeigen, daß keine einzige Methode der HER-2/neu-Bestimmung 100% reliabel und repräsentativ ist. Stattdessen wird der sichere Nachweis der HER-2/neu-Positivität durch mehrere, sich ergänzende HER-2/neu-Testmethoden gestützt. Wenn man alle verfügbaren Materialien für die Therapieentscheidung berücksichtigt und dabei auch den Zeitaspekt durch die Messung von s-HER-2/neu integriert, findet man heraus, daß es keine eindeutige Ja- oder Nein-Entscheidung zum HER-2/neu-Status gibt. Stattdessen ist die HER-2/neu-Expression durchaus linear mit einem fließenden Übergang zwischen HER-2/neu-positiv und HER-2/neu-negativ und wird durch semiquantitatives Scoring künstlich kategorisiert (135).

In der Konkordanzuntersuchung wurde das FISH-Ergebnis als Referenzmethode herangezogen. Dies entspricht aktuellen Empfehlungen, welche der FISH-Diagnostik Vorzug über die IHC geben. In den Herceptin-Zulassungsstudien konnte gezeigt werden, daß die Untergruppe von Patientinnen mit positivem HER-2/neu-Gewebeergebnis in der IHC und der FISH-Diagnostik nochmals einen Überlebensvorteil hatten im Vergleich zu Patientinnen, die nur in der IHC einen positiven HER-2/neu-Nachweis hatten (20;22). Die

IHC-positiven, FISH-negativen Patientinnen fielen überwiegend in die Gruppe der Frauen mit einem Score von +2 in der IHC. Somit beeinflusste das klinische Ergebnis der Therapie die Wahl des diagnostischen Goldstandards und führte zu der Empfehlung, daß ein IHC-Score von +2 durch ein positives FISH-Ergebnis vor der Entscheidung für eine Herceptin-Therapie bestätigt werden sollte (16;21).

Andererseits hat sich die Definition der FISH-Positivität auch mit der Zeit verändert. Die Einschlusskriterien der aktuell laufenden, deutschen Herceptin-Studie (Projekt 2 im Anhang), die das Sicherheitsprofil der Kombination von Herceptin plus Epirubicin und Cyclophosphamid untersucht, ist ein ausgezeichnetes Beispiel für diesen Wandel. Initial qualifizierten nur Patientinnen mit einem IHC-Score von +3 oder einem Score von +2 und einer Genkopiezahl ≥ 12 für die Studie. Aufgrund der langsamen Rekrutierung und der fehlenden internationalen Definition, welche Genkopiezahl zu einem Überlebensvorteil unter Herceptin führt, wurde die notwendige Genkopiezahl für den Studieneinschluss auf >4 reduziert. Sogar nach dem Nachweis der HER-2/neu-Positivität in der FISH-Analyse müssen wir also von einer Heterogenität der Patientinnen durch die unterschiedliche Zahl an Genkopien ausgehen.

Auch bei der HER-2/neu-Diagnose für das Prostatakarzinom stehen wir vor einer ähnlichen Situation: In einer Analyse von $n=30$ Patienten zeigte keiner der Tumoren eine HER-2/neu-Proteinüberexpression im DAKO HercepTest, obwohl in 16/30 Tumoren eine sogenannte „low copy“-Genamplifikation (3-8 HER-2/neu-Signale pro Zellkern) nachgewiesen werden konnten (136). Nur prospektiv randomisierte Studien mit einem Vergleich der IHC- und FISH-Ergebnisse mit dem Ansprechen auf die spezifische, anti-HER-2/neu-gerichtete Therapie könnten die Überlegenheit einer der Methoden beweisen und auch die biologische Bedeutung der low copy-Genamplifikation näher eingrenzen.

Von allen IHC-Schnitten in der Konkordanzanalyse hatten wir auch die IHC-Scores erfragt, die größtenteils an nicht-universitären Einrichtungen erhoben worden waren. Diese IHC-Bestimmungen resultieren aus unterschiedlichen Testansätzen, d. h. unterschiedlichen Antikörpern und Färbeverfahren. Nicht unerwartet korrelierten diese unstandardisierten IHC-Ergebnisse nur eingeschränkt mit den monozentrisch durchgeführten FISH-

Untersuchungen (Konkordanz 80,3%) und dem DAKO HercepTest (Konkordanz 73,8%). Wenngleich diese Ergebnisse wohl das "wahre Leben" widerspiegeln, konnten wir diese unstandardisierten IHC-Ergebnisse für unsere Konkordanzbestimmungen nicht weiter berücksichtigen.

Viele Pathologen stehen der computerisierten und automatisierten Befundung von IHC-Schnitten mit großer Zurückhaltung gegenüber, obwohl dieser Befundungsansatz auf einen erfahrenen Pathologen nicht verzichten kann. Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Konkordanz zwischen der konventionellen Befundung durch einen Pathologen am Lichtmikroskop und der computergestützten Analyse mit 95,1% sehr hoch ist. Dies spricht für die Qualität und die Reproduzierbarkeit beider Befundungsmöglichkeiten. Da gemäß den Empfehlungen der Fachgesellschaften nunmehr a priori zusammen mit dem Östrogenrezeptorstatus auch die HER-2/neu-Expression am Primärtumor standardmäßig befundet werden soll, ist von einem vermehrten Arbeitsaufwand für die Pathologen auszugehen. Die computerisierte Befundung wäre ein eleganter Weg, diese zunehmende Routinearbeit zu bewältigen, insbesondere für Einrichtungen mit sehr hohem Durchsatz oder für Referenzzentren. Die Konkordanz der automatisierten IHC-Evaluierung zur FISH-Methodik war in unseren Untersuchungen höher als die Übereinstimmung der FISH mit der manuellen Befundungstechnik und bestätigt damit die Ergebnisse anderer Studiengruppen (28). Aufgrund der moderaten Zahl an Paraffinschnitten und den überlappenden Konfidenzintervallen darf man dieses Ergebnis zwar nicht überschätzen, es weist aber dennoch auf den individuellen und subjektiven Einflußfaktor hin, den die Befundung durch den Pathologen mit sich bringt.

Wir fanden deutlich höhere s-HER-2/neu-Konzentrationen bei FISH-positiven Patientinnen im Vergleich zu FISH-negativen Frauen. Dieser Anstieg erreichte ein hohes statistisches Signifikanzniveau, obwohl auch die non-shedder in diesem Vergleich berücksichtigt worden waren (8). Die biologische Bedeutung dieses ausbleibenden sheddings, das auf eine Aktivitätsminderung von Metalloproteasen zurückgeführt wird und mit einer reduzierten Invasivität in Zusammenhang gebracht wird, ist letztlich unklar. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß qualitative und quantitative Unterschiede in der Aktivität von Metalloproteasen einen unabhängigen prognostischen Faktor bei soliden Tumoren

darstellen (137-139). Dies paßt auch zu der klinischen Beobachtung, daß Mammakarzinompatientinnen mit sehr hohen s-HER-2/neu-Spiegeln (z. B. >500 ng/ml) nur sehr geringe Chancen haben, selbst auf aggressive Therapieformen anzusprechen (140).

Die Patientinnen der Untergruppe 1 aus Abbildung 36 sind HER-2/neu-negativ laut Befundung auf dem ACIS-System, zeigen zum Zeitpunkt der Fernmetastasierung aber einen erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel. Diese s-HER-2/neu-Konzentrationen sind nicht sehr hoch und erreichen bis auf eine Ausnahme maximal einen Wert von 40 ng/ml. Man muß davon ausgehen, daß diese gering erhöhten s-HER-2/neu-Spiegel eine Funktion der Tumorlast sind. Grundsätzlich läßt sich aber eine klonale Veränderung des Tumors während der Metastasierung nicht ausschließen. Auch ein Primärtumor mit nur geringer HER-2/neu-Expression (DAKO 0 oder +1) beinhaltet HER-2/neu-positive Zellen, die in die Metastasierung hinein selektioniert werden können. Eine dieser Patientinnen aus Gruppe 1 der Abbildung 36 bot einen ungewöhnlich hohen s-HER-2/neu-Spiegel von 127 ng/ml. So eine hohe s-HER-2/neu-Konzentration wurde sonst nur bei HER-2/neu-gewebepositiven Patientinnen beobachtet. Es ist nicht sicher, ob die HER-2/neu-Expression des Primärtumors für die metastasierte Situation bei dieser Patientin wirklich noch repräsentativ ist. Allgemein kann aus der Abbildung 36 der Schluß gezogen werden, daß Patientinnen mit einem s-HER-2/neu-Spiegel >50 ng/ml mit großer Sicherheit auch einen positiven Nachweis von HER-2/neu im Gewebe haben. Dies kann in Einzelfällen weiterhelfen, bei denen aus verschiedensten Gründen kein Material des Primärtumors mehr vorliegt und eine Biopsie aus einer Metastase nicht möglich ist oder nicht gewünscht wird. Andererseits sollten Zweifel an einem HER-2/neu-negativen Gewebeergebnis gehegt werden, wenn bei einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom ein s-HER-2/neu-Spiegel >50 ng/ml vorliegt. In solchen Einzelfällen sollte zunächst der Gewebetest wiederholt werden und im nächsten Schritt über eine Metastasenbiopsie nachgedacht werden, insbesondere wenn Metastasen leicht und ohne großes Risiko zugänglich sind, wie zum Beispiel bei Hautmetastasen oder Lymphknotenmetastasen.

Die Diskussion um Diskordanzen von Proteinexpressionen zwischen dem Primärtumor und seinen Fernmetastasen ist nicht neu und beschränkt sich auch nicht auf das Mammakarzinom. In den achtziger Jahren wurde im Rahmen der Standardisierung der

Assays zur Bestimmung der Steroidhormonrezeptoren von Diskrepanzen um 19% beim ER und um 28% beim PR berichtet, wenn serielle Schnitte eines Mammakarzinoms aufgearbeitet wurden (141-143). In einer kürzlich vorgestellten Untersuchung zu verschiedenen biologischen Markern beim Mammakarzinom erreichten die Diskordanzen zwischen den Primärtumoren und ihren ipsilateralen, axillären Lymphknotenmetastasen Prozentsätze bis zu 30% (144). Kein einziger Marker in dem Panel aus HER-2/neu, p53, bcl-2, Topoisomerase II- α und den heat shock proteins 27 und 70 zeigte 100% konkordante Ergebnisse. Veränderungen der Proteinexpression wurden auch bei Patientinnen unter neoadjuvanter Chemotherapie nachgewiesen, wenn man die Drillbiopsien mit dem Operationspräparat verglich (145).

Diese klinisch relevanten Diskordanzen lassen sich unabhängig von der HER-2/neu-Bestimmungsmethode nachweisen. Edgerton et al. beschrieben sowohl für die IHC mit 2 zugelassenen Antikörpern wie auch für die FISH-Methodik Diskordanzen von rund 20% beim Vergleich von primären Mammakarzinomen mit ihren metachronen Fernmetastasen (146). Diese hohen Diskrepanzen sollten im Zusammenhang mit den Daten von Simon et al. betrachtet werden, die von 5% HER-2/neu-negativen, homogenen primären Mammakarzinomen mit HER-2/neu-positiven regionären Lymphknoten-metastasen berichteten (147). Damit sind die Diskordanzen nicht primär auf methodische Probleme oder Gewebheterogenitäten zurückzuführen. Bei anderen soliden Tumoren wie dem Magen- oder dem Harnblasenkarzinom konnte nachgewiesen werden, daß der Prozentsatz HER-2/neu-exprimierender Läsionen mit dem Erkrankungsverlauf zunimmt (148;149). Dabei war der Anteil der HER-2/neu-positiven Primärtumoren deutlich niedriger als bei regionären Lymphknotenmetastasen und dieser wiederum niedriger als bei Fernmetastasen. Beim Prostatakarzinom wird HER-2/neu während des Übergangs von der androgenabhängigen in die androgenunabhängige Form hochreguliert (150). Erklärungsmöglichkeiten für diese Veränderung könnten die erhöhte Zellmotilität und das verbesserte Evasionspotential von HER-2/neu-positiven, zirkulierenden Tumorzellen sein (151;152). Diese HER-2/neu-positiven, epithelialen Zellen könnten dann ihren Überlebensvorteil ausnutzen und bevorzugt Fernmetastasen setzen.

Gesamtbeurteilung der klinischen Bedeutung der Serummessung von HER-2/neu im Sinne des Algorithmus in Abbildung 1 (siehe Seite 18)

Adjuvante Situation und Nachsorge

Ohne prospektive Kenntnis des HER-2/neu-Status im Gewebe (quasi „blind“) macht eine Serum-HER-2/neu-Messung in der adjuvanten Situation wenig Sinn. Die Wahrscheinlichkeit für ein negatives Ergebnis liegt bei rund 95%.

Mit Veränderung der Pathologie-Standards und der a priori-Kennntnis einer HER-2/neu-Positivität steigt die Sensitivität der selektiven Serum-HER-2/neu-Messung bei HER-2/neu-positiven Patientinnen auf rund 85%, was bedeutet, daß bei HER-2/neu-positiven Patientinnen die biochemische Rezidivdiagnostik den bildgebenden Verfahren fast ebenbürtig sein dürfte. Dies ist umso wichtiger, als die adjuvante Therapie mit Herceptin gerade in klinischen Studien geprüft wird und sich, je nach dem Ergebnis der Studien, etablieren könnte. In dem Gesamtszenario ist die prognostisch ungünstige Bedeutung eines erhöhten s-HER-2/neu-Spiegels vor Einleitung und/oder nach Beendigung einer adjuvanten Chemotherapie gut gesichert. Eine erhöhte Konzentration von HER-2/neu korreliert hierbei mit einem statistisch signifikant kürzerem Intervall bis zum Rezidiv.

Als Intervall der Serum-HER-2/neu-Messung von HER-2/neu-positiven Patientinnen in der adjuvanten Situation erscheint ein Intervall von 3-6 Monaten sinnvoll, stets parallel zu den Nachsorgeuntersuchungen in Anlehnung an die Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft.

Palliative Situation mit Fernmetastasierung

Gewebe HER-2/neu-negativ, s-HER-2/neu-Spiegel nicht erhöht: Dies ist die häufigste Konstellation. Um sinnlose Untersuchungen zu vermeiden, sollten in dieser Situation keine weiteren s-HER-2/neu-Messungen mehr veranlaßt werden, da die Wahrscheinlich für ein

negatives Ergebnis bei über 90% liegt und die Patientinnen nicht durch unnötige Bestimmungen verunsichert werden sollten.

Gewebe HER-2/neu-negativ, s-HER-2/neu-Spiegel erhöht: Hier ergeben sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

- Die Bestimmung am Primärtumor ergab ein falsches Ergebnis.
- Die Erkrankung hat im Rahmen der Metastasierung ihren Status verändert.
- Die Erkrankung ist tatsächlich formell HER-2/neu-negativ, dennoch reicht die Tumormasse bei sehr geringer HER-2/neu-Expression aus, einen erhöhten HER-2/neu-Serumspiegel zu produzieren.

In dieser Konstellation sollte der HER-2/neu-Staus des primären Gewebeblockes mittels Immunhistochemie und FISH erneut überprüft werden. Darüber hinaus sollte eine Metastasenbiopsie in Erwägung gezogen werden, sofern dies an leicht zugänglichen Tumormanifestationen (Haut, Lymphknoten) ohne Gefährdung der Patientin möglich ist. Die Überprüfung der Wirksamkeit von Herceptin in dieser Situation bleibt auf klinische Studien beschränkt. Es ist allerdings wichtig, stets die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß die Erkrankung ihren Status verändern kann.

Gewebe HER-2/neu-positiv, s-HER-2/neu-Spiegel nicht erhöht: Die biologische Ursache für diese Konstellation ist das sogenannte „non-shedding“. Aus größtenteils unbekannten Gründen schilfert die extrazelluläre Domäne von HER-2/neu nicht in das Serum ab. Die Patientinnen qualifizieren uneingeschränkt für eine Herceptin-Therapie. Das Monitoring des s-HER-2/neu-Status sollte mit jedem Restaging mitgeführt werden, da ein sekundärer Anstieg von s-HER-2/neu als Progressionszeichen gewertet werden muß.

Gewebe HER-2/neu-positiv, s-HER-2/neu-Spiegel erhöht: Dies ist die übliche Situation für die s-HER-2/neu-Messung zum Monitoring. Bei einem Anstieg der s-HER-2/neu-Konzentration über 15% im Vergleich zum Vorwert ist mit großer Sicherheit von einem Fortschreiten der Erkrankung auszugehen. Unter einer Herceptin-Therapie kann nicht von einem Nutzen durch die Therapie ausgegangen werden, wenn innerhalb von 4 Wochen nach Therapieeinleitung der s-HER-2/neu-Spiegel nicht um 35% im Vergleich zum Eingangswert absinkt.

Literatur

1. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986;319(6050):226-30.
2. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell* 1982;28(4):865-71.
3. Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35(1):115-32.
4. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230(4730):1132-9.
5. di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987;237(4811):178-82.
6. Segatto O, King CR, Pierce JH, di Fiore PP, Aaronson SA. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 1988;8(12):5570-4.
7. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61(12):4744-9.
8. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59(6):1196-201.
9. Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, Carney W. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J Biol Chem* 1991;266(3):1716-20.
10. Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev Oncog* 1994;5(2-3):313-29.
11. Bayer Corporation, Business Group Diagnostics. Bayer Immuno 1(TM) HER-2/neu Assay Clinical Report, 1999.
12. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
13. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244(4905):707-12.
14. Andersen TI, Paus E, Nesland JM, McKenzie SJ, Borresen AL. Detection of c-erbB-2 related protein in sera from breast cancer patients. Relationship to ERBB2 gene amplification and c-erbB-2 protein overexpression in tumour. *Acta Oncol* 1995;34(4):499-504.
15. Krainer M, Brodowicz T, Zeillinger R, Wiltshcke C, Scholten C, Seifert M et al. Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer. *Oncology* 1997;54(6):475-81.

16. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(7):1974-82.
17. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001;19(2):354-63.
18. Bieche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 1999;45(8Pt1):1148-56.
19. Revillion F, Hornez L, Peyrat JP. Quantification of c-erbB-2 gene expression in breast cancer by competitive RT-PCR. *Clin Chem* 1997;43(11):2114-20.
20. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L et al. First-line herceptin(r) monotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 2001;61 Suppl S2:37-42.
21. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC, Stoler MH, Jenkins RB, Grogan TM. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol* 2001;19(10):2714-21.
22. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
23. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2659-71.
24. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2639-48.
25. Cook GB, Neaman IE, Goldblatt JL, Cambetas DR, Hussain M, Luftner D et al. Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21(2B):1465-70.
26. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981;47(1):207-14.
27. Bayer Corporation, Business Group Diagnostics. Bayer Immuno 1 System Report, 1999.
28. Wang S, Saboorian MH, Frenkel EP, Haley BB, Siddiqui MT, Gokaslan S et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer. Automated Cellular Imaging System (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol* 2001;116(4):495-503.
29. Bauer KD, Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C et al. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 2000;6(9):3552-9.
30. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):305-19.

31. Robertson JF, Jaeger W, Syzmendera JJ, Selby C, Coleman R, Howell A et al. The objective measurement of remission and progression in metastatic breast cancer by use of serum tumour markers. European Group for Serum Tumour Markers in Breast Cancer. *Eur J Cancer* 1999;35(1):47-53.
32. Hayes DF. Tumor markers for breast cancer. *Ann Oncol* 1993;4(10):807-19.
33. Tondini C, Hayes DF, Gelman R, Henderson IC, Kufe DW. Comparison of CA15-3 and carcinoembryonic antigen in monitoring the clinical course of patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res* 1988;48(14):4107-12.
34. Basuyau JP, Blanc-Vincent MP, Bidart JM, Daver A, Deneux L, Eche N et al. [Standards, Options and Recommendations (SOR) for tumor markers in breast cancer. SOR Working Group]. *Bull Cancer* 2000;87(10):723-37.
35. Saghatchian M, Guepratte S, Floiras J, Paternostre B, and Pichon M. Correlation of serum ERBB-2 concentration with initial clinico-biological presentation and patients' outcome in primary breast cancer. *Proc ASCO* 2001;20:62b.
36. Brunner E. Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten. Oldenburg Verlag, München, Wien, Oldenburg, 1999.
37. Sachs L. Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Ausgabe 9, 1999.
38. Molina R, Jo J, Filella X, Bruix J, Castells A, Hague M et al. Serum levels of C-erbB-2 (HER-2/neu) in patients with malignant and non-malignant diseases. *Tumour Biol* 1997;18(3):188-96.
39. Dia J. Clinical utility of an automated serum HER-2/neu assay in monitoring patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem* 1998;44(6):A47.
40. Payne RC, Allard JW, Anderson-Mausser L, Humphreys JD, Tenney DY, Morris DL. Automated assay for HER-2/neu in serum. *Clin Chem* 2000;46(2):175-82.
41. Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H et al. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13(5):1129-35.
42. Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Mu nM et al. c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: prognostic value. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51(2):109-19.
43. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14(3):737-44.
44. Gion M, Mione R, Leon AE, Luftner D, Molina R, Possinger K et al. CA27.29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. *Eur J Cancer* 2001;37(3):355-63.
45. Perissi V, Menini N, Cottone E, Capello D, Sacco M, Montaldo F et al. AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene* 2000;19(2):280-8.
46. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;10(12):2435-46.

-
47. Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor- positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 1998;4(1):7-12.
 48. McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BM et al. Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 1991;51(12):3296-303.
 49. Ciocca DR, Fujimura FK, Tandon AK, Clark GM, Mark C, Lee-Chen GJ et al. Correlation of HER-2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(16):1279-82.
 50. Kobayashi S, Iwase H, Itoh Y, Fukuoka H, Yamashita H, Kuzushima T et al. Estrogen receptor, c-erbB-2 and nm23/NDP kinase expression in the intraductal and invasive components of human breast cancers. *Jpn J Cancer Res* 1992;83(8):859-65.
 51. Antoniotti S, Taverna D, Maggiora P, Sapei ML, Hynes NE, De Bortoli M. Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br J Cancer* 1994;70(6):1095-101.
 52. Bates NP, Hurst HC. An intron 1 enhancer element mediates oestrogen-induced suppression of ERBB2 expression. *Oncogene* 1997;15(4):473-81.
 53. Antoniotti S, Maggiora P, Dati C, De Bortoli M. Tamoxifen up-regulates c-erbB-2 expression in oestrogen-responsive breast cancer cells in vitro. *Eur J Cancer* 1992;28(2-3):318-21.
 54. Dati C, Antoniotti S, Taverna D, Perroteau I, De Bortoli M. Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene* 1990;5(7):1001-6.
 55. Read LD, Keith D, Jr., Slamon DJ, Katzenellenbogen BS. Hormonal modulation of HER-2/neu protooncogene messenger ribonucleic acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1990;50(13):3947-51.
 56. Balsari A, Casalini P, Tagliabue E, Greco M, Pilotti S, Agresti R et al. Fluctuation of HER2 expression in breast carcinomas during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1999;155(5):1543-7.
 57. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18(21):3651-64.
 58. Schmid P, Untch M, Wallwiener D, Kossé V, Bondar G, Vassiljev L, Tarutinov V, Kienle E, and Possinger K. Cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus hormonal ablation with leuporelin acetate as adjuvant treatment of node-positive, premenopausal breast cancer patients: Preliminary results of the TABLE Study (Takeda Adjuvant Breast Cancer Study with Leuporelin acetate). *Anticancer Res* 2002; 22:2325-32.
 59. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(8):2334-56.
 60. Baselga J, Seidman AD, Rosen PP, Norton L. HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: therapeutic implications. *Oncology (Huntingt)* 1997;11(3Suppl2):43-8.
 61. Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P, Anderson S et al. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1698-706.

-
62. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14(10):2702-8.
 63. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, Perez-Carrion R, Boni C, Monnier A et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2001;19(10):2596-606.
 64. Kaufmann M, Bajetta E, Dirix LY, Fein LE, Jones SE, Zilembo N et al. Exemestane is superior to megestrol acetate after tamoxifen failure in postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III randomized double-blind trial. The Exemestane Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18(7):1399-411.
 65. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol* 2001;19(2):343-53.
 66. Nabholz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *J Clin Oncol* 2000;18(22):3758-67.
 67. Aapro MS. Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th international conference, St. Gallen, February 2001. *Oncologist* 2001;6(4):376-85.
 68. Thuerlimann B. International consensus meeting on the treatment of primary breast cancer 2001, St. Gallen, Switzerland. *Breast Cancer* 2001;8(4):294-7.
 69. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(18):1346-60.
 70. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330(18):1260-6.
 71. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(18):1361-70.
 72. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992;10(7):1049-56.
 73. Wright C, Nicholson S, Angus B, Sainsbury JR, Farndon J, Cairns J et al. Relationship between c-erbB-2 protein product expression and response to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1992;65(1):118-21.
 74. Yamauchi H, O'Neill A, Gelman R, Carney W, Tenney DY, Hosch S et al. Prediction of response to antiestrogen therapy in advanced breast cancer patients by pretreatment circulating levels of extracellular domain of the HER-2/c-neu protein. *J Clin Oncol* 1997;15(7):2518-25.
 75. Bieche I, Onody P, Lerebours F, Tozlu S, Hacene K, Andrieu C et al. ERBB2 status and benefit from adjuvant tamoxifen in ERalpha-positive postmenopausal breast carcinoma. *Cancer Lett* 2001;174(2):173-8.

-
76. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002;20(14):3095-105.
 77. Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. *J Clin Oncol* 1999;17(1):434.
 78. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(7):1800-8.
 79. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L et al. Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(6):1467-72.
 80. Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, Cirrincione CT, Rodrigue SP, Berry DA et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662. *Clin Cancer Res* 2001;7(9):2703-11.
 81. Wong WL, Bajamonde A, Nelson B, Carney W, and Mass RD. Baseline serum HER2 (sHER2) levels in the pivotal Herceptin Breast Cancer Trials: A comparison of 2 ELISA methods. *Proc ASCO* 2000;19:77a.
 82. Baron AT, Lafky JM, Connolly DC, Peoples J, O'Kane DJ, Suman VJ et al. A sandwich type acridinium-linked immunosorbent assay (ALISA) detects soluble ErbB1 (sErbB1) in normal human sera. *J Immunol Methods* 1998;219(1-2):23-43.
 83. Baron AT, Lafky JM, Boardman CH, Balasubramaniam S, Suman VJ, Podratz KC et al. Serum ErbB1 and epidermal growth factor levels as tumor biomarkers in women with stage III or IV epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(2):129-37.
 84. Lüftner D, Flath B, Henschke P, Geppert R, Wernecke KD, and Possinger K. Elevation of the serum HER2/neu and EGFR levels is associated with short progression-free survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001;69:257.
 85. Carney W, Burrell M, Morris L, and Hamer P. Normal levels of serum EGFR and decreases in several cancers. *Proc AACR* 2002; 43:47.
 86. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002;20(4):1000-7.
 87. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(12):913-20.
 88. Marx III J, Leitzel K, Ali S, Carney W, Hamer P, Linnartz R, and Lipton A. Serum uPA in patients with pancreatic cancer. *Proc AACR* 2002; 43:396.
 89. Bon GG, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Mensdorff-Pouilly S, Hilgers J, Kenemans P. Quantification of MUC1 in breast cancer patients. A method comparison study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83(1):67-75.

90. Bon GG, Mensdorff-Pouilly S, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Hilgers J et al. Clinical and technical evaluation of ACS BR serum assay of MUC1 gene-derived glycoprotein in breast cancer, and comparison with CA 15-3 assays. *Clin Chem* 1997;43(4):585-93.
91. Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers* 2000;15(4):343-56.
92. McKenzie SJ, Marks PJ, Lam T, Morgan J, Panicali DL, Trimpe KL et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for the human neu oncogene product, p185. *Oncogene* 1989;4(5):543-8.
93. Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Casado A et al. Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2356-62.
94. Mehta RR, McDermott JH, Hieken TJ, Marler KC, Patel MK, Wild LD et al. Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16(7):2409-16.
95. Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH. The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology* 1998;55(1):33-8.
96. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jager W. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43(1):87-95.
97. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1:S15-S19.
98. Koeppen HK, Wright BD, Burt AD, Quirke P, McNicol AM, Dybdal NO et al. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 2001;38(2):96-104.
99. Taverna D, Antoniotti S, Maggiora P, Dati C, De Bortoli M, Hynes NE. erbB-2 expression in estrogen-receptor-positive breast-tumor cells is regulated by growth-modulatory reagents. *Int J Cancer* 1994;56(4):522-8.
100. Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G et al. Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the c-erbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 1995;63(4):560-7.
101. Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC. Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene* 2000;19(4):490-7.
102. Bagli L, Dittadi R, Zancan M, Panzini I, Monti F, Ravaioli A. HER-2/neu serum levels and menopausal status. *Int J Biol Markers* 2001;16(1):69-70.
103. Meden H, Mielke S, Marx D, Wuttke W, Kuhn W. Hormonal treatment with sex steroids in women is associated with lower p105 serum concentrations. *Anticancer Res* 1997;17(4B):3075-7.
104. Mielke S, Meden H, Raab T, Wuttke W, Kuhn W. Effects of interfering and influencing factors on the analyses of p105 (c-erbB-2/HER-2) oncoprotein fragment in serum. *Anticancer Res* 1997;17(4B):3125-7.

105. Goldhirsch A, Gelber RD, Castiglione M, O'Neill A, Thurlimann B, Rudenstam CM et al. Menstrual cycle and timing of breast surgery in premenopausal node-positive breast cancer: results of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG) Trial VI. *Ann Oncol* 1997;8(8):751-6.
106. Hagen AA, Hrushesky WJ. Menstrual timing of breast cancer surgery. *Am J Surg* 1998;175(3):245-61.
107. Veronesi U, Luini A, Mariani L, Del Vecchio M, Alvez D, Andreoli C et al. Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. *Lancet* 1994;343(8912):1545-7.
108. Oliver DJ, Ingram DM. Timing of surgery during the menstrual cycle for breast cancer: possible role of growth factors. *Eur J Cancer* 1995;31A(3):325-8.
109. Fentiman IS, Gregory WM, Richards MA. Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. *Lancet* 1994;344(8919):402.
110. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24(2):85-95.
111. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2001;19(18):3808-16.
112. Pritchard KI. Use of ErbB-1 and ErbB-2 to select endocrine therapy for breast cancer: will it play in Peoria? *J Clin Oncol* 2001;19(18):3795-7.
113. Lipton A, Mouridsen H, Ali S, Leitzel K, Demers L, Harvey H, Chaudri-Ross HA, Brady C, Dugan M, and Carney W. Serum HER-2/neu and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2002;69:210.
114. Stender MJ, Neuberger D, Wood W, Sledge G. Correlation of circulating c-erb B-2 extracellular domain (Her-2) with clinical outcome in patients with metastatic breast cancer (MBC). *Proc ASCO* 1997;16:A541.
115. Gianni L, Capri G, Valagussa P, Bonadonna G. Putting taxanes to work in operable breast cancer: a search for selective indications from empirical studies. *Recent Results Cancer Res* 1998;152:314-22.
116. Volm M, Yee H, Symmans WF, Formenti S, Oratz R, Shapiro R et al. HER2 status predicts response to preoperative paclitaxel in patients with breast cancer. *Proc ASCO* 1999;18:A394.
117. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997;15(5):537-47.
118. Konecny G, Thomssen C, Pegram M, Lück H, Untch M, Pauletti G et al. HER-2/neu gene amplification and response to paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *Proc ASCO* 2001;20:23a.
119. Seidman AD, Hudis CA, Albanel J, Tong W, Tepler I, Currie V et al. Dose-dense therapy with weekly 1-hour paclitaxel infusions in the treatment of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16(10):3353-61.
120. Perez EA, Irwin DH, Patel R, Vogel CL, Kirshner J. A large phase II trial of paclitaxel administered as a weekly one hour infusion in patients with metastatic breast cancer. *Proc ASCO* 1999;18:126a.

-
121. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, Tan L, Kaptain S, Bach A et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001;19(10):2587-95.
 122. Sporn JR, Bilgrami SA. Weekly paclitaxel plus Herceptin in metastatic breast cancer patients who relapse after stem-cell transplant. *Ann Oncol* 1999;10(10):1259-60.
 123. Marx III J, Leitzel K, Ali S, Demers L, Almokadem S, Makhoul I, Carney W, Hamer P, Brady C, Dugan M, Wyld P, and Lipton A. Serum EGFR in metastatic breast cancer patients. *Proc ASCO* 2002; 21:436a.
 124. Baselga J. Combined anti-EGF receptor and anti-HER2 receptor therapy in breast cancer: a promising strategy ready for clinical testing. *Ann Oncol* 2002;13(1):8-9.
 125. Normanno N, Campiglio M, De LA, Somenzi G, Maiello M, Ciardiello F et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. *Ann Oncol* 2002;13(1):65-72.
 126. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001;61(24):8887-95.
 127. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 2001;61(19):7184-8.
 128. Janicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H et al. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24(3):195-208.
 129. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19(6):1865-78.
 130. Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15(4):330-3.
 131. Ebeling FC, Schmitt UM, Untch M, Nagel D, Fateh-Moghadam A, Stieber P et al. Tumour markers CEA and CA 15-3 as prognostic factors in breast cancer--univariate and multivariate analysis. *Anticancer Res* 1999;19(4A):2545-50.
 132. Ali SM, Leitzel K, Chinchilli VM, Engle L, Demers L, Harvey HA et al. Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem* 2002;48(8):1314-20.
 133. Kostler W, Schwab B, Singer C, Neumann R, Marton E, Brodowicz T, Tomek S, Steger G, Wiltshcke C, Krainer M, and Zielinski C. Serial monitoring of serum HER-2/neu extracellular domain (ECD) can predict response to trastuzumab-based therapy in patients with breast cancer. *Proc ASCO* 2002; 21:17a.
 134. Brodowicz T, Wiltshcke C, Budinsky AC, Krainer M, Steger GG, Zielinski CC. Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 1997;73(6):875-9.
 135. Eppenberger-Castori S, Kueng W, Benz C, Caduff R, Varga Z, Bannwart F et al. Prognostic and predictive significance of ErbB-2 breast tumor levels measured by enzyme immunoassay. *J Clin Oncol* 2001;19(3):645-56.

-
136. Gandour-Edwards R, Liu HL, Lara PN, de Vere-White R, and LaSalle JM. Detection of low level HER-2/neu gene amplification in prostate cancer(CAP) by fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Proc ASCO* 2001;20:733.
 137. Simojoki M, Santala M, Risteli J, Kauppila A. Carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) in predicting prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001;82(1):110-5.
 138. Santala M, Risteli J, Risteli L, Puistola U, Kacinski BM, Stanley ER et al. Synthesis and breakdown of fibrillar collagens: concomitant phenomena in ovarian cancer. *Br J Cancer* 1998;77(11):1825-31.
 139. Santala M, Simojoki M, Risteli J, Risteli L, Kauppila A. Type I and III collagen metabolites as predictors of clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(12):4091-6.
 140. Harris L, Luftner D, Jager W, Robertson JF. c-erbB-2 in serum of patients with breast cancer. *Int J Biol Markers* 1999;14(1):8-15.
 141. Raemaekers JM, Beex LV, Koenders AJ, Pieters GF, Smals AG, Benraad TJ et al. Concordance and discordance of estrogen and progesterone receptor content in sequential biopsies of patients with advanced breast cancer: relation to survival. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984;20(8):1011-8.
 142. Hull DF, III, Clark GM, Osborne CK, Chamness GC, Knight WA, III, McGuire WL. Multiple estrogen receptor assays in human breast cancer. *Cancer Res* 1983;43(1):413-6.
 143. Li BD, Byskosh A, Molteni A, Duda RB. Estrogen and progesterone receptor concordance between primary and recurrent breast cancer. *J Surg Oncol* 1994;57(2):71-7.
 144. Cardoso F, Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, Rouas G, Dolci S et al. Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes. *Ann Oncol* 2001;12(5):615-20.
 145. Mackay HJ, Cameron D, Rahilly M, Mackean MJ, Paul J, Kaye SB et al. Reduced MLH1 expression in breast tumors after primary chemotherapy predicts disease-free survival. *J Clin Oncol* 2000;18(1):87-93.
 146. Edgerton SM, Merkel DE, Moore DH, Thor AD. HER-2/neu/ErbB-2 status by immunohistochemistry and FISH: Clonality and progression with recurrence and metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2000;64(1):55.
 147. Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(15):1141-6.
 148. Chariyalertsak S, Sugano K, Ohkura H, Mori Y. Comparison of c-erbB-2 oncoprotein expression in tissue and serum of patients with stomach cancer. *Tumour Biol* 1994;15(5):294-303.
 149. Jimenez RE, Grignon DJ, Vaishampayan U, Hussain M. Analysis of HER-2/neu overexpression in primary and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. *Proc ASCO* 2000;19:329a.
 150. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 1999;5(3):280-5.
 151. Roetger A, Merschjann A, Dittmar T, Jackisch C, Barnekow A, Brandt B. Selection of potentially metastatic subpopulations expressing c-erbB-2 from breast cancer tissue by use of an extravasation model. *Am J Pathol* 1998;153(6):1797-806.

152. Brandt B, Roetger A, Heidl S, Jackisch C, Lelle RJ, Assmann G et al. Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein- positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1998;76(6):824-8.

Abkürzungen

ACIS	automated cellular imaging system
AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie e. V. der Deutschen Krebsgesellschaft
ALAT	Alaninaminotransferase
AUC	area under the curve
AT	Doxorubicin, Paclitaxel
BR	best response
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CA 15-3	carbohydrate antigen 15-3
CA 27.29	carbohydrate antigen 27.29
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CB	clinical benefit
CD	cluster of differentiation
CEA	carcino-embryonales Antigen
Chx	Chemotherapie
CI	Konfidenzintervall
CNV	Cyclophosphamid, Mitoxantron, Etoposid
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
CR	komplette Remission
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DIG	Digoxigenin
DÖSOSG	Deutsch-Österreichisch-Schweizerische Onkologische Studiengemeinschaft
EC	Kombination aus Epirubicin und Cyclophosphamid
ECD	extrazelluläre Domäne von HER-2/neu
EF	kardiale Ejektionsfraktion
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FP	Falsch Positive
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GCP	good clinical practice
GnRH	Gonadotropin releasing hormone

HER1	human epidermal growth factor receptor 1
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunhistochemie
KG	Körpergewicht
LH	luteinisierendes Hormon
LK	Lymphknoten
Mab	monoklonaler Antikörper
MUC-1	mucin 1, Mitglied der Muzinglykoprotein-Familie
MW	Mittelwert
ns	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PBD	phosphatgepuffertes Detergens
PD	progressive disease
PDE	protein digestion enzyme
PR	partielle Remission oder auch Progesteronrezeptor (im Kontext international anerkannte Abkürzungen)
RLU	relative light units
RN	Richtig Negative
ROC-Kurve	receiver operating characteristics-Kurve
SD	Standardabweichung oder auch stabile disease (im Kontext international anerkannte Abkürzungen)
s-EGFR	EGFR im Serum
SSC	NaCl und NaCitrat-enthaltender Puffer (saline sodium citrate)
s-CTA	serum clinical trial assay aus den Herceptin-Zulassungsstudien
s-HER-2/neu	HER-2/neu im Serum
s-uPA	UPA im Serum
Table	Randomisierte, kontrollierte, multizentrische Vergleichsstudie zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von Leuprorelinacetat versus CMF- Chemotherapie in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms
TMB	Tetramethylbenzidin
UICC	Union Internationale contre le Cancer
uPA	urokinase plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor
WW	Wechselwirkungen

Registered trade marks mit Kontaktadressen

Trade mark	Beschreibung	Kontaktadresse
ACIS [®]	Automated Cellular Imaging System; System zur computerisierten Befundung von mit dem HercepTest [®] gefärbten Immunhistochemieschnitten	ChromaVision Medical Systems 33171 Paseo Cerveza San Juan Capistrano, CA 92675-4824 USA
ACS:180 [®]	klinisch-chemischer Analysenapparat von Bayer Diagnostics	Bayer Vital GmbH & Co. KG Geschäftsbereich Diagnostics Siemensstraße 3 35463 Fernwald
Bayer Diagnostics [®]	Diagnostikfirma – Tochterfirma der Bayer [®] AG mit u. a. deutscher und amerikanischer Zweigstelle	Adresse der deutschen Zweigstelle siehe ACS:180 [®] ; amerikanische Zweigstelle: Bayer Diagnostics 511 Benedict Avenue Tarrytown, NY 10591-5097 USA
Chiron Diagnostics [®]	ELISA-Assay zur Bestimmung von s-HER-2/neu; kommerziell nicht mehr erhältlich	früher: Chiron Diagnostics 4560 Horton Street W-180 Emeryville, CA 94608 USA
Immuno 1 [®]	klinisch-chemischer Analysenapparat	Adresse der deutschen und amerikanischen Zweigstelle siehe Bayer Diagnostics [®]
HercepTest [®]	immunhistochemischer Test zur HER-2/neu-Bestimmung an Paraffinschnitten	DAKO Diagnostika GmbH Postfach 70 04 07 22004 Hamburg
Herceptin [®]	generic name: Trastuzumab; humanisierter, monoklonaler anti- HER-2/neu-Antikörper	Hoffmann-La Roche AG Emil-Barell-Straße 1 79630 Grenzach-Wyhlen
Oncogene Diagnostics [®]	ELISA-Assay zur Bestimmung von s- HER-2/neu	Oncogene Science Bayer Corporation 80 Rogers Street Cambridge, MA 02142-1168 USA
Taxol [®]	generic name: Paclitaxel; Zytostatikum aus der Gruppe der Taxane	Bristol-Myers Squibb Saporrobogen 6-8 80809 München

Trade mark	Beschreibung	Kontaktadresse
Ventana®	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung zur Bestimmung der HER-2/neu-Amplifikation an Paraffinschnitten	Oncor 209 Perry Parkway Gaithersburg, MD 20877 USA
Zeiss®	Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Carl Zeiss Promenade 10 07745 Jena

Technische und finanzielle Unterstützung

Die automatisierten ACS:180[®]- und Immuno 1[®]-Plattformen inklusive der Verbrauchsmaterialien für die CA 27.29- und die s-HER-2/neu-Bestimmung wurden von der Bayer[®] Vital GmbH & Co. KG, Geschäftsbereich Diagnostics, mit Sitz in Fernwald und Leverkusen zur Verfügung gestellt.

Die beiden manuellen kits (Chiron Diagnostics[®] und Oncogene Diagnostics[®]) zur HER-2/neu-Bestimmung im Serum wurden von Bayer[®] Diagnostics (vormals Chiron Diagnostics[®]) mit Sitz in Tarrytown, NY (USA) bzw. Emeryville, CA (USA) finanziert. Die amerikanische Zweigstelle von Bayer[®] Diagnostics unterstützte auch die Anstellung einer Vollzeit-MTA, insbesondere zur Wartung der beiden oben genannten klinisch-chemischen Analysenapparate und zum Aufbau einer Probenbank.

Das ACIS[®]-System zur computerisierten Befundung von HER-2/neu-Immunhistochemie-Schnitten nach Färbung mit dem DAKO HercepTest[®] wurde von der Firma Chromavision[®] bereitgestellt.

Die DAKO[®] Diagnostika GmbH mit Sitz in Hamburg stellte Immunhistochemie-kits für die HER-2/neu-Konkordanzanalysen zur Verfügung.

Danksagung

Mein vorrangiger Dank gilt Herrn Prof. K. Possinger, Direktor der Medizinischen Klinik II der Charité am Campus Mitte, für die uneingeschränkte Möglichkeit zur klinisch-experimentellen Arbeit in seiner Abteilung und für die jahrelange, persönliche Unterstützung durch seine konstruktiv-kritischen Ratschläge.

Die Datenerhebung für diese Habilitationsschrift wäre nicht möglich gewesen ohne die Einbindung in die Mammakarzinom-Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II. Alle Kollegen haben mitgearbeitet am Aufbau einer national wie international beachteten Probenbank. Dies gilt insbesondere auch für die Mitarbeiter in der Patientenannahme und der medizinischen Dokumentation.

Die statistischen Berechnungen wurden im Institut für Medizinische Biometrie des Universitätsklinikums Charité, Campus Virchow-Klinikum, durch Herrn Prof. K-D. Wernecke (Direktor) und seine Mitarbeiter Frau Dr. B. Wegner und Herrn G. Kalb durchgeführt. Ohne die Begleitung durch dieses Team wären wichtige Ergebnisse unerkant geblieben.

Besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der deutschen und amerikanischen Zweigstellen von Bayer Diagnostics[®], die mir neben der technischen und finanziellen Unterstützung insbesondere mit ihrem Fachwissen zur Seite standen.

Die Plasmen von 27 Patientinnen unter Herceptin-Therapie wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. G. Schaller zur Verfügung gestellt, damals Oberarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. H. Weitzel) und nunmehr Direktor der Frauenklinik im Marienhospital Herne der Ruhr-Universität Bochum.

Die Färbungen auf HER-2/neu mittels FISH wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. A. Müller, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Ulm (Direktor: Prof. R. Kreienberg), durchgeführt. Für die Zusammenarbeit in bezug auf die immun-

histochemischen Färbungen und die entsprechende Befundung ist den Mitarbeitern der Institute für Pathologie der Charité, Humboldt-Universität Berlin (Direktor: Prof. M. Dietel), und des Klinikums Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin (Direktor: Prof. H. Stein), zu danken. Die technische Betreuung des ACIS®-Systems erfolgte hierbei durch Frau Dr. M. Ploghöft, Mitarbeiterin der Firma Chromavision®.

Innerhalb der HER-2/neu-Kernarbeitsgruppe möchte ich hervorheben: Frau R. Geppert (Forschungs-MTA) und meine Doktorandinnen Frau cand. med. P. Henschke (wissenschaftliche Hilfskraft), Frau cand. med. S. Felsenstein (wissenschaftliche Hilfskraft), Frau cand. med. S. Schildhauer (wissenschaftliche Hilfskraft) sowie Frau cand. med. S. Schnabel und Frau cand. med. H. Dilk, die stets beharrlich und mit guter Laune Hand in Hand gearbeitet haben.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ort, Datum

Dr. med. Diana Lüftner

Anhang über weitere themenbezogene Forschungsprojekte

Projekt 1:

Konkordanzanalyse zur s-HER-2/neu-Expression von Mammakarzinomen und ihren metachronen Fernmetastasen mittels IHC, FISH und Serum-HER-2/neu-Status

Da die Fallzahl aus der Konkordanzanalyse begrenzt war, begannen wir in Zusammenarbeit mit den Instituten für Pathologie des Universitätsklinikums Charité am Campus Mitte und des Universitätsklinikums Benjamin Franklin eine große Konkordanzanalyse mit einer gemäß statistischer Berechnung notwendigen Fallzahl von $n=156$. Hierfür wurden in beiden Instituten nach Paaren von primären Mammakarzinomen und deren metachronen Metastasen gesucht. Diese wurden dann auf die Expression von HER-2/neu mittels einer Immunhistochemie nach dem DAKO-Standard sowie mit der FISH-Methodik untersucht. Von 25 dieser Patientinnen lag gleichzeitig Serum vom Zeitpunkt der Fernmetastasierung vor.

Bislang konnten 60 dieser Paare gefunden werden. Die Paraffinblöcke werden derzeit geschnitten und immunhistochemisch gefärbt. Gleichzeitig werden Schnitte für die FISH-Untersuchung asserviert. Es ist damit zu rechnen, daß die Untersuchung ungefähr im 2. Quartal 2003 abgeschlossen werden kann.

Ziel ist die Konkordanzbestimmung für die HER-2/neu-Gewebeergebnisse aus der IHC und der FISH-Methodik. Damit soll hinterfragt werden, ob es während der Metastasierung zu einer klonalen Veränderung der HER-2/neu-Expression kommt.

Projekt 2:

Kardiale Sicherheit des rekombinanten, humanisierten anti-p185^{HER2} monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) in Kombination mit Epirubicin/Cyclophosphamid als Erstlinientherapie bei Anthracyclin-naiven Patientinnen mit HER-2/neu-überexprimierenden, metastasiertem Mammakarzinom

Ziel dieser prospektiv randomisierten Multicenterstudie ist die Evaluierung der Sicherheit und Wirksamkeit der Kombination aus Herceptin plus Epirubicin und Cyclophosphamid als Erstlinientherapie von HER-2/neu-positiven Mammakarzinompatientinnen im Stadium der Fernmetastasierung. Die Studie wird durch einen Vergleichsarm, in dem HER-2/neu-negative Patientinnen mit Epirubicin und Cyclophosphamid allein behandelt werden, kontrolliert. Insgesamt werden 125 Patientinnen in jeden Arm aufgenommen. Dabei erfolgt die Therapie in jedem Arm in Form einer Dosiseskalation auf 2 Dosierungsstufen. In der Dosisstufe 1 (n=25) wird Epirubicin in einer Dosierung von 60 mg/m² verabreicht. Beim Ausbleiben von kardialen Nebenwirkungen wird die Dosis von Epirubicin auf 90 mg/m² erhöht und weitere 100 Patientinnen auf dieser Dosisstufe behandelt. Cyclophosphamid wird dabei stets in einer Dosierung von 600 mg/m² appliziert.

Einschlußkriterien: Patientinnen im Alter von 18 bis 70 Jahren; histologisch gesichertes Mammakarzinom; klinisch oder bildgebend gesicherte Fernmetastasierung; meßbare oder evaluierbare Erkrankung; Performancestatus besser als 70%; Lebenserwartung von mindestens 3 Monaten; schriftliches Einverständnis.

Ausschlußkriterien: Vorangegangene Chemotherapie für die metastasierte Erkrankung (eine adjuvante nicht-anthracyklinhaltige Chemotherapie oder auch eine Hormontherapie für die metastasierte Erkrankung sind möglich); vorangegangene Anthracyklintherapie; vorangegangene Hochdosistherapie; Knochenmetastasen als einzige Tumormanifestation; Hirnmetastasierung bei Studieneinschluß; vorangegangene, andere maligne Erkrankung außer Carcinoma *in situ* der Cervix und Karzinome der Haut außer Melanom; Beeinträchtigung der hämatologischen Reserve oder unzureichende Leber- und Nierenfunktionsparameter; unkontrollierte Infektions- oder andere chronische Erkrankung, welche die Teilnahme an der Studie kompromittieren könnten.

Kardiale Ausschlußkriterien: Vorbehandlung mit kardiotoxischen Zytostatika; bekannte koronare Herzerkrankung; behandlungsbedürftige Erkrankung der Herzklappen; bekannte Kardiomyopathie; akute Myokarditis; Herzinsuffizienz mit definierter Symptomatik; Ejektionsfraktion <60% oder linksventrikulärer Durchmesser >56 mm; schlecht eingestellter arterieller Hypertonus; vorangegangene Mediastinalbestrahlung.

In den einzelnen Zentren werden zu Therapiebeginn, dann wöchentlich über 7 Wochen und im Anschluß alle 3 Wochen EDTA-Plasmaproben abgenommen und per Kurier an ein Zentrallabor geschickt, wo sie bei 1000 g über 15 min zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C asserviert werden. In größeren batches werden diese Proben auf Trockeneis nach Berlin geschickt und dort mit dem manuellen Oncogene-Assay auf s-HER-2/neu und CA 27.29 untersucht.

Eine erste vorläufige Analyse der Patientinnen auf Dosisstufe I zeigte, daß zur Woche 4 der s-HER-2/neu-Spiegel bei respondern im Mittel um 138,6 ng/ml gesunken war, was einem relativen Abfall von 73,8% im Vergleich zu baseline entspricht. In der gleichen Zeit sank der CA 27.29-Spiegel nur um 59 U/ml ab. In der Woche 10 lag der mittlere s-HER-2/neu-Spiegel bei Patientinnen mit objektivem Ansprechen bei einem Niveau von 9% im Vergleich zu baseline.

Projekt 3:

Evaluierung des automatisierten Serum-HER-2/neu-Immuno 1-Assays sowie des manuellen Serum-HER-2/neu-Oncogene SciencE-ELISA-Assays bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter Herceptin-Therapie

Mit dem 2. Quartal 2002 nimmt die Tumormarkergruppe der Medizinischen Klinik II erneut an einer FDA-Studie zur Bedeutung von s-HER-2/neu teil. Bei dieser Untersuchung wird von Patientinnen unter einer Herceptin-basierten systemischen Therapie zum Zeitpunkt der Therapieeinleitung sowie im regelmäßigen, longitudinalen follow-up Serum asserviert und auf s-HER-2/neu mittels manuellem Oncogene ELISA-Assay wie auch auf dem klinisch-chemischen Analysenapparat Immuno 1 untersucht.

Die primären Endpunkt der Studie sind die Monitoringqualität von s-HER-2/neu unter Herceptin-Therapie sowie die prädiktive Wertigkeit des baseline-s-HER-2/neu-Spiegels und des relativen Abfalls von s-HER-2/neu innerhalb der ersten 8 Wochen nach Therapieeinleitung. Des Weiteren soll untersucht werden, ob eine langfristige Normalisierung von s-HER-2/neu unter den oberen cut-off-Wert von 15 ng/ml zu einem verbesserten outcome, insbesondere einer längeren Zeit bis zur Progression, führt.

Es handelt sich um eine Multicenter-Studie, an der noch 3 weitere, amerikanische Zentren (D. Slamon, UCLA Los Angeles; M. Schwartz, MSKCC New York; F. Esteva, M.D. Anderson Cancer Center, Houston) teilnehmen. Das Rekrutierungsziel liegt bei 125 Patientinnen innerhalb von 6 Monaten. In einer Substudie untersucht die Medizinische Klinik II der Charité als ausgewähltes Studienzentrum die s-HER-2/neu-Spiegel vor und 1 Stunde nach Herceptin-Gabe. Es sollen aus diesen Proben sowohl die s-HER-2/neu-Spiegel wie auch die Komplexe von s-HER-2/neu und dem therapeutischen Antikörper Herceptin bestimmt werden, um den Einfluß von s-HER-2/neu auf die Pharmakokinetik von Herceptin näher zu beschreiben.

Die Messungen von s-HER-2/neu erfolgen sowohl multizentrisch innerhalb der Studienzentren sowie auch monozentrisch in einem Zentrallabor des Sponsors Bayer Diagnostics.

Projekt 4:

Hochdosischemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation im Vergleich zu einer intensiven, konventionellen Polychemotherapie

Zwischen den Jahren 1998 und 2002 untersuchten wir den Nutzen einer up front-Doppelhochdosistherapie mit Cyclophosphamid, Mitoxantron und Etoposid (CNV) im Vergleich zu der zum Untersuchungsbeginn als beste, konventionelle Chemotherapie eingeschätzten Therapie mit Doxorubicin und Paclitaxel (AT). Die Datenlage wies dabei auf einen möglichen Nutzen der Hochdosistherapie für die Subgruppe der HER-2/neu-positiven Patientinnen hin. Im Sinne der Fragestellung nach dem Einfluß der HER-2/neu-Positivität auf den Nutzen der beiden Chemotherapie-Ansätze wurden die Patientinnen gemäß dem immunhistochemischen HER-2/neu-Status sowie dem s-HER-2/neu-Status zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Stadiums IV der Erkrankung eingeteilt. Die finale Auswertung wird mit Komplettierung des Datensatzes im 3. Quartal 2003 erwartet.

Einschlußkriterien: histologisch gesichertes Mammakarzinom in fernmetastasierter Situation; Indikation für eine systemische Chemotherapie; meßbare oder evaluierbare Metastasen in mindestens 1 Organsystem; Alter >18 Jahre und <60 Jahre; rezidivfreies Intervall ≥ 6 Monate nach adjuvanter zytostatischer Therapie; Ausschluß einer Schwangerschaft; adäquate hämatologische Funktionsparameter; Kooperationsfähigkeit und informed consent. *Ausschlußkriterien:* adjuvante Hochdosischemotherapie; zerebrale Metastasierung; alleinige Knochenmetastasierung; vorangegangene palliative zytostatische Chemotherapie; Überlebenswahrscheinlichkeit <12 Wochen; vorbestehende, schwere Begleiterkrankungen; Leber- oder Nierenfunktionseinschränkung mit Transaminasen bzw. Serumkreatinin >1,25-fache des oberen Referenzwertes; relevante infektiöse Begleiterkrankungen; kardiale Begleiterkrankungen, insbesondere manifeste arterielle Hypertonie mit diastolischen Blutdruckwerten >120 mmHg, hämodynamisch relevanter Herzklappenfehler, Arrhythmien >Lown IIIa, Endokarditis, latente oder manifeste Herzinsuffizienz, Ejektionsfraktion <50%, Anamnese eines Myokardinfarktes; unzureichende Kooperationsfähigkeit; Zweitkarzinom; Teilnahme an einer anderen klinischen Studie.

Die Randomisierung erfolgte in 2 Therapiearme: Die *Hochdosisgruppe* erhielt den ersten Hochdosisblock der Doppelhochdosistherapie mit Cyclophosphamid 2000 mg/m^2 als 1-stündige Infusion am Tag 1 unter Protektion mit Uromitexan (Kurzinfusionen mit 500 mg/m^2 alle 6 Stunden), Mitoxantron 45 mg/m^2 am Tag 1 als Kurzinfusion und Etoposid 2500 mg/m^2 ebenfalls am Tag 1 mit Gabe von je 500 mg absolut in 1000 ml NaCl 0,9% über je 2 Stunden. Nach einem Intervall von 24 Stunden nach Ende der Hochdosistherapie erfolgte die Stammzelltransplantation in Form von kryokonservierten, CD34-positiven Stammzellen. Diese wurden vor der 1. Hochdosistherapie nach Cyclophosphamid-Gabe mit 2000 mg/m^2 unter üblichem Uromitexan-Schutz und anschließender G-CSF-Gabe mit 10 µg/kg Körpergewicht (KG) gewonnen. Spätestens ab Tag 5 nach der Transplantation wurde das engraftment durch die Gabe von G-CSF in einer Dosis von 10 µg/kg KG unterstützt. Ab Tag 3 bis zum Wiederanstieg der Leukozyten über $1000/\mu\text{l}$ erfolgte eine selektive Darmdekontamination mit Cotrimoxazol (800 mg Sulfamethoxazol, 160 mg Trimethoprim) 3 x täglich, Colistin 3 x 200 mg täglich sowie Amphotericin B-Suspension 4 x 1 mg/Tag. Sobald wieder eine Leukozytenzahl von $>5000/\mu\text{l}$ nach der Regeneration der Zellzahlen erreicht war, wurden erneut CD34-positive Stammzellen für den 2. Block der Doppelhochdosistherapie separiert. Die 2. Hochdosistherapie unterschied sich vom 1. Block durch eine höhere Dosis von Cyclophosphamid mit 4400 mg/m^2 und Uromitexan mit 1000 mg/m^2 alle 6 Stunden.

Im *konventionellen Therapiearm* wurde im Abstand von 3 Wochen nach üblicher Prämedikation eine Chemotherapie mit Paclitaxel 200 mg/m^2 als 3-Stundeninfusion und Doxorubicin 60 mg/m^2 als Kurzinfusion verabreicht. Die Therapie war über 6 Zyklen bzw. bis zur Progression vorgesehen. War nach 6 Zyklen eine partielle Remission (PR) erreicht und eine komplette Remission (CR) abzusehen, wurde die zytostatische Behandlung als Paclitaxel-Monotherapie um 3 weitere Zyklen fortgesetzt. Nach den Zyklen 2 bzw. 4 wurde G-CSF subkutan in einer Dosis von 5 µg/kg KG bzw. 10 µg/kg KG zur Stammzellmobilisation verabreicht.

Patientinnen mit Knochenmetastasen erhielten in beiden Therapiearmen zusätzlich zur Chemotherapie eine Behandlung mit Pamidronat 90 mg alle 3 Wochen. Mit dem Ziel der Remissionserhaltung wurden alle Patientinnen mit CR nach Abschluß der Chemotherapie

mit Tamoxifen (20 mg/Tag) oder nach vorangegangener Antiöstrogentherapie mit Letrozol (2,5 mg/Tag) bis zum Nachweis der Progression behandelt.

Die gesamte Studie war in einem *cross-over* der beiden Therapiearme konzipiert: Die Patientinnen mit CR auf eine der beiden geschilderten Therapien wurden bei erneuter Progression in den anderen Randomisationsarm gekreuzt. Voraussetzung für das *cross-over* aus dem Doppelhochdosisarm war eine kardiale Ejektionsfraktion (EF) >50%. Falls die EF <50% lag, wurde Doxorubicin durch Vinorelbin in einer Dosis von 15 mg/m² ersetzt. Beim *cross-over* aus dem konventionellen Therapiearm erhielten die Patientinnen bei einer EF <50% anstelle von Mitoxantron Carboplatin in einer Dosis von 1500 mg/m². Dann wurde die Stammzelltransplantation aufgrund der längeren Halbwertszeit erst 48 Stunden nach Beendigung der Chemotherapie durchgeführt.

Mit der Randomisationszuordnung der individuellen Patientin wurden den Zentren die Plastikgefäße für die *Asservierung der Serum-aliquots* mit den entsprechenden Aufklebern zugesandt. Die Serumproben für die HER-2/neu-Bestimmungen wurden gemäß dem Amendment für Begleituntersuchungen direkt in den Zentren abgenommen und verarbeitet: 10 ml venöses Blut wurde zentrifugiert, in 2 aliquots portioniert und bei -30 °C vor Ort eingefroren. Die Abnahmen erfolgten im Hochdosisarm vor Hochdosis 1, 4 Wochen nach Hochdosis 1, unmittelbar vor Hochdosis 2, 4 Wochen nach Hochdosis 2 und im weiteren Verlauf alle 2 Monate bis zum *cross-over* oder Studienende. Im konventionellen Therapiearm wurde zu jedem Therapiezyklus, im Monat 1 nach dem letzten Zyklus und weiterhin ebenfalls alle 2 Monate Serum asserviert.

In einer Zwischenanalyse, in der die Patientinnen mit erhöhtem s-HER-2/neu im Vergleich zu normalem s-HER-2/neu-Spiegel unabhängig vom Behandlungsarm verglichen wurden, zeigte sich bislang kein Unterschied in der Rate an objektiven Remissionen. Dieses vorläufige Ergebnis stützt die Meinung, daß HER-2/neu-positive Patientinnen von einer sehr intensiven Chemotherapie profitieren und sich in ihrem outcome nicht mehr von den HER-2/neu-negativen Patientinnen unterscheiden. Eine Verschiebung dieses Ergebnisses ist noch vorstellbar, wenn mit einer höheren Patientenzahl eine getrennte Analyse der beiden Studienarme möglich wird.

Projekt 5:

Cyclophosphamid und Epirubicin mit nachfolgender Gabe von Taxol in 21-Tage-Intervallen versus intensivierte Gabe von Epirubicin gefolgt von Taxol in 14-Tage-Intervallen in der adjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms mit 1-3 befallenen Lymphknoten (1-3 LK+)

Ziel der Zusatzuntersuchung zu oben genannter Phase III-Studie für die adjuvante Chemotherapie ist die Abschätzung der prognostischen Bedeutung des s-HER-2/neu-Spiegels bei nodal-positiven Mammakarzinompatientinnen mit 1-3 befallenen Lymphknoten im allgemeinen sowie im Vergleich einer konventionellen adjuvanten Chemotherapie mit einem dosisintensivierten Therapieschema. In einer retrospektiven Studie an 78 Mammakarzinompatientinnen konnte die Anzahl der befallenen Lymphknoten (>3 LK versus ≤ 3 LK) und der s-HER-2/neu-Spiegel als einzige prognostisch relevante Faktoren identifiziert werden. Allerdings reichte die statistische power nur aus, die prognostische Wertigkeit des s-HER-2/neu-Spiegels für Patientinnen mit >3 LK zu sichern. Für die Gruppe mit ≤ 3 LK war die Fallzahl für eine signifikante Aussage zu gering. Des Weiteren möchten wir die Frage klären, ob durch die zusätzliche Messung von s-HER-2/neu eine Subgruppe von Patientinnen mit 1-3 LK identifiziert werden kann, die potentiell von einer dosisdichten Therapie profitiert.

Als weiterer Aspekt ist die Korrelation zwischen der HER-2/neu-Expression des Primärtumors im Vergleich zu seiner Metastase Teil dieser Zusatzuntersuchung. Gegenwärtig gehen die Kliniker davon aus, daß die HER-2/neu-Expressionen des Primärtumors und seiner metachronen Metastasen identisch sind. Es ist aber nicht auszuschließen, daß, ähnlich wie beim Steroidhormonrezeptorstatus, während der Metastasierung klonale Veränderungen stattfinden.

Die hohe Fallzahl in dieser Studie (n=890) wird es auch ermöglichen, die Ergebnisse zur Regulation von HER-2/neu aus der Table-Studie zu verifizieren. Die Frage nach einem Anstieg von s-HER-2/neu unter hormoneller Ablation kann getrennt für prämenopausale und postmenopausale Patientinnen gestellt werden. In einer vorläufigen, orientierenden Analyse zeigt sich ähnlich wie bei der Table-Studie ein Anstieg von s-HER-2/neu um rund

2 ng/ml, ohne daß der obere cut-off-Wert von 15 ng/ml überschritten wird. Es ist zu beachten, daß die meisten Patientinnen in dieser Studie bei Ersterkrankung bereits postmenopausal sind.

Als weiteren Teilaspekt werden wir erstmals die Bedeutung von s-EGFR und s-uPA im Komplex mit seinem Antagonisten PAI-1 für die adjuvante Situation des Mammakarzinoms überprüfen. Es ist unbekannt, ob auch in der adjuvanten Situation ein Teil der Mammakarzinompatientinnen einen erniedrigten s-EGFR-Spiegel aufweist. Durch die Größe der Studie wird es möglich sein, Subgruppen anhand der s-EGFR- und s-HER-2/neu-Spiegel bilden zu können. Außerdem gilt es, die prognostische Bedeutung von s-uPA mit den Daten zu uPA und PAI-1 im Gewebe zu vergleichen.

Um all diese Fragen zu beantworten, wird im Sinne eines „limited samplings“ zur Reduktion des logistischen Aufwands jeweils zum ersten und zum letzten Chemotherapiezyklus sowie im Rezidiv ein Serumröhrchen auf dem Eilpostweg von den Zentren in unser Labor versandt. Des Weiteren erfolgt eine immunhistochemische Färbung des HER-2/neu-Status am Primärtumor sowie am Rezidivgewebe, sofern dies bei leicht zugänglichen Tumormanifestationen wie Haut, Lymphknoten oder Lokalrezidiv bzw. Brustwand gefahrlos und mit dem Einverständnis der Patientin möglich ist.
